

12

Pedro L. Lorenzo González

"MADURACION IN VITRO DE OOCITOS DE GANADO VACUNO".

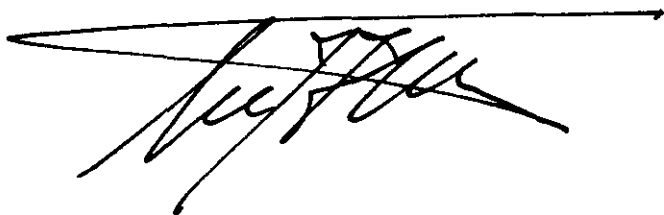
Departamento de Fisiología Animal
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
1992

**"MADURACION IN VITRO DE OOCITOS
DE GANADO VACUNO".**

**MEMORIA que para la obtención del
grado de Doctor, presenta el
Licenciado en Veterinaria D. Pedro
L. Lorenzo González.**

**ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA
BAJO LA DIRECCION DE:**

Prof. Dra. Josefina María Illera del Portal.

A stylized, handwritten signature in black ink, likely belonging to Prof. Dra. Josefina María Illera del Portal. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the top.

**Licenciado D. Pedro L. Lorenzo
González, aspirante al Grado de
Doctor en Veterinaria.**

A handwritten signature in black ink, likely belonging to Pedro L. Lorenzo González. The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath.

Madrid, Noviembre de 1992.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Memoria no habría sido posible sin la participación de muchas personas a las que, desde aquí, quiero agradecer sinceramente su ayuda.

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Dña. Josefina M^a Illera del Portal ya que, con sus directrices y orientaciones, fue encaminando poco a poco este trabajo. Sus buenos consejos y su tesón, desde el comienzo del trabajo hasta hoy, han posibilitado que esta Tesis se haya llevado a cabo.

En segundo lugar, al Dr. D. Juan Carlos Illera del Portal, al que debo el inicio de mi andadura por el Departamento de Fisiología Animal. Sería difícil expresar lo mucho que ha supuesto para mí su constante estímulo y valiosa ayuda en la realización del presente trabajo.

También quiero manifestar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Mariano Illera Martín, Catedrático-Director del Departamento de Fisiología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme proporcionado, por un lado, la infraestructura y el apoyo material necesario para la realización de esta Memoria y por otro, los buenos consejos que de él he recibido a lo largo de este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Pelayo Jiménez, Director Veterinario del matadero GYPISA, de Pozuelo de Alarcón, las facilidades ofrecidas que permitieron recoger las muestras empleadas en este trabajo, así como a todo el personal de las naves de matanza, especialmente a Ismael. También a todo el personal del CENSYRA de Colmenar Viejo, especialmente a D. Miguel Jiménez Cabras, por la ayuda ofrecida para conseguir el semen congelado.

A D. Fernando Pescador, Director del Servicio Informático de la UCM en Somosaguas, por su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico de los resultados. También quiero expresar mi sincero agradecimiento a M^a José Álvarez por el tiempo que me ha dedicado.

A todos mis compañeros del Departamento de Fisiología Animal, especialmente a la Dra. Gema Silván, por el ánimo y ayuda que me ha dado en todo momento; al Dr. Joaquín Sánchez, por sus consejos; a Ana Portela, por su apoyo; a Ramón Esteban, Joaquín Arellano y Ana Blass, por la valiosa ayuda que me han prestado; a M^a José Martínez-Alesón; a M^a José Mazarrón y, especialmente, a Teresa Calduch, por su compañía y ayuda durante tantos y tantos viajes al matadero.

Deseo agradecer también a Pilar, mi mujer, la ayuda y la enorme paciencia que ha demostrado durante los años que ha durado este trabajo y a mis padres y hermanos, sobre todo José Enrique por su colaboración con las "matemáticas", el ánimo que me han dado durante todo este tiempo.

Por último, agradecer a mis amigos, especialmente a José, Pilar y Guillermo, la paciencia y la valiosa ayuda que me han prestado durante todos estos años.

A mi mujer y a mi hija.

CONTENIDO

I.- INTRODUCCION	1-4
II.- REVISION BIBLIOGRAFICA	5
1.- MADURACION DEL OOCITO	6
1.1.- OOGENESIS Y FOLICULOGENESIS.	6
1.1.1.- Cronología.	6
1.1.2.- Oogénesis	7
1.1.3.- Foliculogénesis	9
1.1.4.- Maduración del oocito	10
1.2.- OBTENCION DE LOS OOCITOS	12
1.2.1.- Oocitos post-ovulatorios.	12
1.2.2.- Oocitos pre-ovulatorios	13
1.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MADURACION	
<i>IN VITRO</i>	14
1.3.1.- OBTENCION DE OVARIOS Y OOCITOS.	14
1.3.1.a.- Obtención de los ovarios	14
1.3.1.b.- Selección del folículo	15
1.3.1.c.- Obtención de los oocitos	15
1.3.1.d.- Selección y clasificación.	16
1.3.2.- METODOS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i>	17
1.3.2.a.- Medios de cultivo.	17
1.3.2.b.- Modificaciones de los medios	17
1.3.2.b.1.- Suero.	18
1.3.2.b.2.- Otras sustancias	19
1.3.2.c.- Condiciones del cultivo <i>in</i>	
<i>vitro</i>	19
1.3.2.c.1.- Temperatura.	20
1.3.2.c.2.- P. osmótica.	20
1.3.2.c.3.- pH.	20
1.3.2.c.4.- Atmósfera gaseosa.	20
1.3.2.c.5.- Duración.	21

1.3.2.d.- Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	21
1.3.2.e.- Sustancias foliculares en la maduración <i>in vitro</i>	23
1.3.2.e.1.- Líquido folicular.	23
1.3.2.e.2.- Cél. de la granulosa.	24
1.3.2.f.- Reguladores de la maduración <i>in vitro</i>	25
1.- Hormonas.	25
a.- Gonadotropinas.	25
b.- Esteroides.	27
c.- Otras.	28
2.- Sistema AMPc.	28
1.3.3.- DESCRIPCION DEL OOCITO MADURO	30
1.3.3.a.- Morfología del oocito inmaduro.	31
1.3.3.b.- Morfología durante la maduración.	31
1.3.3.c.- Morfología del oocito maduro	32
 2.- FECUNDACION.	
2.1.- TRANSPORTE DE LOS GAMETOS.	34
2.1.1.- Gameto femenino	34
2.1.2.- Gameto masculino	34
2.2.- CAPACITACION ESPERMATICA	36
2.3.- FECUNDACION	40
2.4.- FECUNDACION <i>IN VITRO</i>	43
2.4.1.- MADURACION DEL OOCITO	45
2.4.2.- OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES	46
2.4.3.- METODOS DE CAPACITACION <i>IN VITRO</i>	47
2.4.4.-FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CAPACITACION <i>IN VITRO</i>	49
2.4.4.1.- Temperatura	49
2.4.4.2.- pH	49
2.4.4.3.- Concentración	49

	<u>Pág</u>
2.4.4.4.- <i>Tiempo</i>	49
2.4.4.5.- <i>Medios</i>	49
2.4.4.6.- <i>Osmolaridad</i>	50
2.4.4.7.- <i>Variaciones individuales</i>	50
2.4.4.8.- <i>Sustancias que influyen en</i> <i>la capacitación in vitro</i>	51
<i>a.- Glicosaminoglicanos</i>	51
<i>b.- Factores de motilidad</i>	52
<i>c.- Ionóforos</i>	52
<i>d.- Cafeína</i>	52
<i>e.- Nucleótidos cíclicos</i>	52
<i>f.- Proteínas del estro</i>	53
<i>g.- PAF</i>	53
2.4.4.9.- <i>Células del cúmulo</i>	53
2.4.5.- CONDICIONES DE INSEMINACION	54
2.4.5.1.- <i>Tiempo</i>	54
2.4.5.2.- <i>Concentración espermática</i>	54
2.4.5.3.- <i>Condiciones fisicoquímicas</i>	55
2.4.5.4.- <i>Medios</i>	55
2.4.5.5.- <i>Sustancias favorecedoras</i>	56
2.4.6.- CRITERIOS DE FECUNDACION	56
2.4.7.- APLICACIONES DE LA FECUNDACION <i>IN VITRO</i>	58
3.- FACTORES DE CRECIMIENTO.	59
3.1.- INTRODUCCION	59
3.2.- FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF)	61
3.2.a.- <i>Estructura</i>	61
3.2.b.- <i>Receptor</i>	61
3.2.c.- <i>Mecanismo de acción</i>	62
3.2.d.- <i>Acción ováricas y en maduración</i> <i>in vitro</i>	62

3.3.- FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF)	64
3.3.a.- Estructura	64
3.3.b.- Receptor	65
3.3.c.- Mecanismo de acción	62
3.3.d.- Acción ováricas y en maduración <i>in vitro</i>	62
3.4.- FACTOR DE TRANSFORMACION DEL CRECIMIENTO (TGF)	68
3.5.- FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLASTICO (FGF)	69
3.6.- FACTOR DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO (PDGF)	70
3.7.- FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)	71
3.- MATERIAL Y METODOS	72
1.- MADURACION <i>IN VITRO</i>	73
1.1. MATERIAL	73
1.1.1.- EQUIPO	73
1.1.2.- MEDIOS DE CULTIVO	76
1.1.2.1.- Medio de transporte	76
1.1.2.2.- Medio de lavado	76
1.1.2.3.- Medio de maduración	76
1.1.3.- PREPARACION DE LOS MEDIOS	78
1.2.- METODOS	78
1.2.1.- OBTENCION DE LOS OVARIOS	78
1.2.2.- OBTENCION DE LOS OOCITOS	79
1.2.2.a.- Selección	80
1.2.2.b.- Clasificación	81
1.2.3.- CONDICIONES DE MADURACION <i>IN VITRO</i>	81
1.2.4.- EXPERIENCIAS DE MADURACION <i>IN VITRO</i>	82
1.- Experimento 1.	82
2.- Experimento 2.	83
3.- Experimento 3.	85

2.- FECUNDACION <i>IN VITRO</i>	86
2.1.- MATERIAL	86
2.1.1.- EQUIPO	86
2.1.2.- MEDIOS DE FECUNDACION <i>IN VITRO</i>	86
2.1.2.1.- Medio de lavado de espermat	87
2.1.2.2.- Medio de lavado de oocitos	87
2.1.2.3.- Medio de fecundación	87
2.1.3.- PREPARACION DE LOS MEDIOS	88
2.2.- METODOS	88
2.1.2.- OBTENCION DEL SEMEN	88
2.2.2.- PREPARACION DEL SEMEN	89
I.- <i>Descongelado</i>	89
II.- <i>Sep. frac. móvil</i>	90
III.- <i>Lavado</i>	91
IV.- <i>Inducción a la capacitación</i>	92
2.2.3.- PREPARACION DE LOS OOCITOS	92
2.2.4.- CONDICIONES DE INSEMINACION	92
2.2.5.- PRUEBAS DE FECUNDACION <i>IN VITRO</i>	93
1.- Experimento 1	93
2.- Experimento 2	93
3.- FIJACION Y TINCION	94
4.- VALORACION DE LOS RESULTADOS	96
4.1.- Expansion del cumulo celular	96
4.2.- Maduracion <i>in vitro</i>	97
4.3.- Fecundacion <i>in vitro</i>	98
5.- ANALISIS ESTADISTICO	99

	<u>Pág</u>
IV.- RESULTADOS	101
1.- Recuperación de oocitos	102
2.- Expansión del cúmulo celular	104
3.- Pruebas de maduración <i>in vitro</i>	110
4.- Pruebas de fecundación <i>in vitro</i>	128
V.- DISCUSION	139
1.- Obtención de ovarios y oocitos	141
2.- Expansión del cúmulo celular	150
3.- Pruebas de maduración <i>in vitro</i>	157
4.- Pruebas de fecundación <i>in vitro</i>	173
VI.- CONCLUSIONES	186
VII.- BIBLIOGRAFIA	188
VIII.- INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS	228

ABREVIATURAS.

Acido γ -amino butírico	GABA
Acido dexosirribonucleico	ADN
Acido ribonucleico	ARN
Adenosín mono fosfato cíclico.	AMPc
Albúmina sérica bovina.	BSA
Anafase I.	A-I
Caseín-quinasa II.	CK-II
Corpúsculo polar.	CP
Dalton	Da
Desaparición de la vesícula germinal.	GVBD
Espacio perivitelino.	EPV
Factor activador de las plaquetas	PAF
Factores de crecimiento.	FC
Factor de crecimiento epidérmico.	EGF
Factor de crecimiento fibroblástico.	TGF
Factor de crecimiento nervioso.	NGF
Factor de crecimiento plaquetario.	PDGF
Factor de crecimiento similar a la insulina.	IGF
Factor de crecimiento del pronúcleo masculino.	MPGF
Factor de las células de la granulosa.	GCF
Factor de transformación del crecimiento.	TGF
Factor promotor de la maduración.	MPF
Fecundación <i>in vitro</i> .	FIV
Fosfodiesterasa	PDE
Gauge	G
Glicosaminoglicanos	GAGs
Gonadotropina coriónica humana.	hCG
Gránulos corticales.	GC
Guanosín mono fosfato cíclico	GMPC
Hormona estimulante del tiroides.	TSH
Hormona folículo estimulante.	FSH

Hormona liberadora de gonadotropinas.	GnRH
Hormona luteinizante.	LH
Inhibidor de la maduración del oocito.	OMI
Líquido folicular.	LF
Medio definido	DM-HIS
Medio Krebs-Ringer-Bicarbonato modificado	KRB-m
Medio mínimo esencial	MEM
Medio Tyrode (albúmina-lactato-piruvato)	TALP
Metafases I y II.	M-I, M-II
Prolactina.	PRL
Pronúcleo.	PN
Protein-quinasa C.	PKC
Proteína asociada al estro.	EAP
Proteínas de zona pelúcida	ZP
Retículo endoplásmico rugoso.	REr
Solución fosfato-salina	PBS
Suero fetal bovino.	SFB
Suero de vaca en estro.	SVE
Sustancia inhibidora de la maduración.	MIS
Telofase I.	T-I
Vesícula germinal.	GV

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Para que la fecundación de los gametos masculino y femenino pueda llevarse a cabo, es necesario que ambos completen una serie de etapas previas; el oocito debe estar maduro y el espermatozoide capacitado (Chang, 1951; Austin, 1951).

Los oocitos inmaduros de los mamíferos se encuentran en el interior del folículo ovárico rodeados de una masa de células somáticas y mantenidos en un estado de reposo meiótico (dictiatio); este estado se evidencia por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal. Este estado de reposo se mantiene hasta que llega la oleada preovulatoria de gonadotropinas que provocará que, el oocito inicie su maduración nuclear mientras que el cúmulo celular que le rodea se mucifica y se expande. De esta manera, en el momento de la ovulación, el oocito está rodeado de un cúmulo expandido a la vez que nuclearmente ha progresado hasta llegar a la metafase de la segunda división meiótica, hecho evidenciado por la extrusión del primer corpúsculo polar al espacio perivitelino. Por su parte, el espermatozoide debe completar los procesos de capacitación y reacción acrosómica (consistentes, fundamentalmente, en alteraciones de la membrana del espermatozoide), que le permiten liberar las enzimas contenidas en el acrosoma (Yanagimachi, 1988).

Estos procesos -maduración y capacitación- han sido muy estudiados con el fin de intentar reproducirlos en condiciones *in vitro* (Chang, 1951; Austin, 1951; Edwards, 1965). De esta manera, mediante la utilización de estas técnicas en la especie bovina, se han conseguido nacimientos de terneros procedentes de la fecundación *in vitro* de oocitos madurados *in vivo* (Brackett *et al.*, 1982) e *in vitro* (Critser *et al.*, 1986; Goto *et al.*, 1988).

Todo sistema de fecundación *in vitro* (FIV) requiere la maduración de los oocitos, de cuyo éxito depende el de la fecundación (First y Parrish, 1987). Los

oocitos inmaduros bovinos pueden madurar en un cultivo *in vitro* bajo condiciones adecuadas, pero, es cierto que, todavía, existen mecanismos no aclarados en la maduración de los oocitos que permiten que, los que han madurado *in vivo*, puedan fecundarse mejor que los que lo han hecho *in vitro* (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). Esto es debido, probablemente, a la existencia de factores hormonales o foliculares intraováricos que no son añadidos a los medios y que intervienen decisivamente en la maduración completa del oocito.

A lo largo de los años, se han estudiado los factores que favorecen el proceso de la maduración *in vitro*; en este sentido, los medios de maduración se han suplementado con hormonas o compuestos séricos. Las primeras se utilizan debido a que las gonadotropinas (FSH y LH) y algunas hormonas esteroideas (estradiol 17 β) tienen un papel fundamental en el desarrollo del folículo y en la maduración del oocito, habiéndose empleado por multitud de autores (Bae y Foote, 1975; Moor y Trounson, 1977; Fukui *et al.*, 1982; Ball *et al.*, 1983, etc.). La suplementación sérica también se ha empleado de una manera rutinaria en los medios de maduración *in vitro*, con objeto de ofrecer una fuente proteica y energética al oocito durante la maduración (Leibfried y First, 1979). El suero fetal bovino ha sido el más utilizado aunque, Sanbuissho y Threlfall indicaron en 1989 que, la utilización de suero de vaca en estro, en los mismos medios, aumentaba las cifras de maduración y la capacidad de fecundación de los oocitos.

Aparte de estos compuestos, se ha descrito que, en el proceso de la maduración de los oocitos, además de las hormonas, influyen multitud de compuestos intraováricos que también ejercen un control sobre la maduración. Entre estas sustancias, se encuentran los factores de crecimiento (Hammond *et al.*, 1985), que han demostrado su participación en la regulación de muchas de las funciones ováricas (Carson *et al.*, 1989; Hill, 1989). En concreto, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), participa en las funciones de proliferación y diferenciación de las células de la granulosa mientras que el factor de crecimiento similar a la insulina del tipo 1 (IGF-1), se comporta como un agente mitogénico muy potente en las mismas células. Las acciones de estos factores se realizan mediante receptores localizados

en las membranas celulares (Vlodasky *et al.*, 1978) y por un sistema de mensajeros celulares (Hill 1989).

Durante estos últimos años, numerosos estudios señalan que los factores de crecimiento participan en el control meiótico del oocito. En este sentido, Dekel y Serizly (1985), Feng *et al.* (1988) y Downs (1989) demostraron la capacidad de algunos de estos factores para reactivar la meiosis de oocitos de rata y ratona y, de esta manera, conseguir la maduración *in vitro* de los mismos.

El objetivo de nuestro estudio es examinar el posible papel jugado por estos factores de crecimiento en los sistemas de maduración *in vitro* de oocitos bovinos, ya que, se ha demostrado su participación en las últimas fases del desarrollo folicular en condiciones *in vivo* (Tonetta y DiZerega, 1986) y también *in vitro* (Dekel y Serizly, 1985). Además, también se pretende averiguar si la acción de estos factores de crecimiento se efectúa o se favorece por la presencia o no del cúmulo celular que rodea al oocito.

De esta manera, en nuestro trabajo se intenta analizar la posible actuación que estos compuestos tienen, por sí mismos y suplementados con sueros, en medios de maduración sin ninguna suplementación hormonal exógena sobre los siguientes aspectos: a) la expansión del cúmulo celular durante la maduración *in vitro* de los oocitos, ya que, esta es una de las referencias que pueden indicar el grado de maduración alcanzado por el oocito; 2) en la maduración *in vitro*, mediante técnicas de fijación y tinción que permiten valorar el estadio meiótico alcanzado y, finalmente, 3) en la fecundación *in vitro*, para comprobar si, los oocitos, madurados con ayuda de estos factores de crecimiento, pueden fecundarse correctamente con espermatozoides capacitados *in vitro*.

Los resultados obtenidos de todas estas experimentaciones permitirán ayudar al esclarecimiento de algunas de las funciones fisiológicas que tienen estos factores de crecimiento, en lo relativo a la maduración y fecundación y, de qué manera y por qué medios, efectúan su acción sobre el oocito.

REVISION
BIBLIOGRAFICA

1.- MADURACION DE OOCITOS.

1.1.- OOGENESIS Y FOLICULOGENESIS.

1.1.1.- Cronología.

El ovario fue reconocido ya como una entidad anatómica independiente por Herófilo de Alejandria (300 A d C) y descrito con detalle por Sorano de Efeso (50 D d C); sin embargo, el oocito de los mamíferos no pudo ser identificado hasta el siglo XIX (Von Baer 1827). Anteriormente, De Graaf (1670), señaló acertadamente, que los oocitos provenían del ovario, aunque se equivocó al considerar que todo el folículo (folículo de Graaf) era el gameto femenino. En el año 1825 Von Baer describe la relación anatómica existente entre el folículo y el oocito en mamíferos. Waldeyer (1870), fue el primer investigador en plantear que las hembras de los mamíferos poseían una cantidad finita de oocitos, que es única para toda su vida reproductiva. Zuckermann *et al.* demostraron, en la década de los años 1950, la exactitud de esa teoría. Goette (1875) y Nussbaum (1880), reconocieron que las células primordiales germinales, destinadas a constituir los futuros oocitos, se forman de células indiferenciadas y se disponen en cordones sexuales en la vida intrauterina. A principios del siglo XX se avanzó considerablemente en el conocimiento de las funciones del ovario y, además, se establecieron, y conocieron más profundamente, las relaciones entre el oocito y el desarrollo folicular (Brambell, 1927; Pincus, 1936). En esta época, Pincus y Enzmann (1935), fueron los pioneros en comparar el comportamiento de los oocitos *in vivo* e *in vitro*. Finalmente, se llega a las décadas de los años 1960 y 1970, caracterizadas por la gran cantidad de trabajos que estudian el metabolismo y los requerimientos bioquímicos del cultivo *in vitro* de oocitos en diversas especies animales (Edwards, 1965; Brinster, 1967; Biggers, 1971; Donahue, 1972; Channing y Tsafri, 1977; Thibault *et al.*, 1977; todos estos autores han sido revisados por Wassarman, 1988).

1.1.2.- Oogénesis.

El número de gametos que poseen las hembras domésticas está fijado desde el mismo momento de su nacimiento, y serán, durante toda la vida del animal, los únicos capaces de ser fecundados (Zuckermann, 1962). En la vida embrionaria comienza la oogénesis o formación del gameto femenino. A partir de unas células indiferenciadas se producen las *células germinales primordiales* (Eddy *et al.*, 1981; Byskov, 1982). Estas, por migración, llegarán a la cresta genital, donde se formará la futura gónada (Gondos, 1978). Las células primordiales se multiplican mitóticamente y una parte de éstas se diferenciarán y formarán las *oogonias*, células base a partir de las que se formará el oocito o gameto femenino.

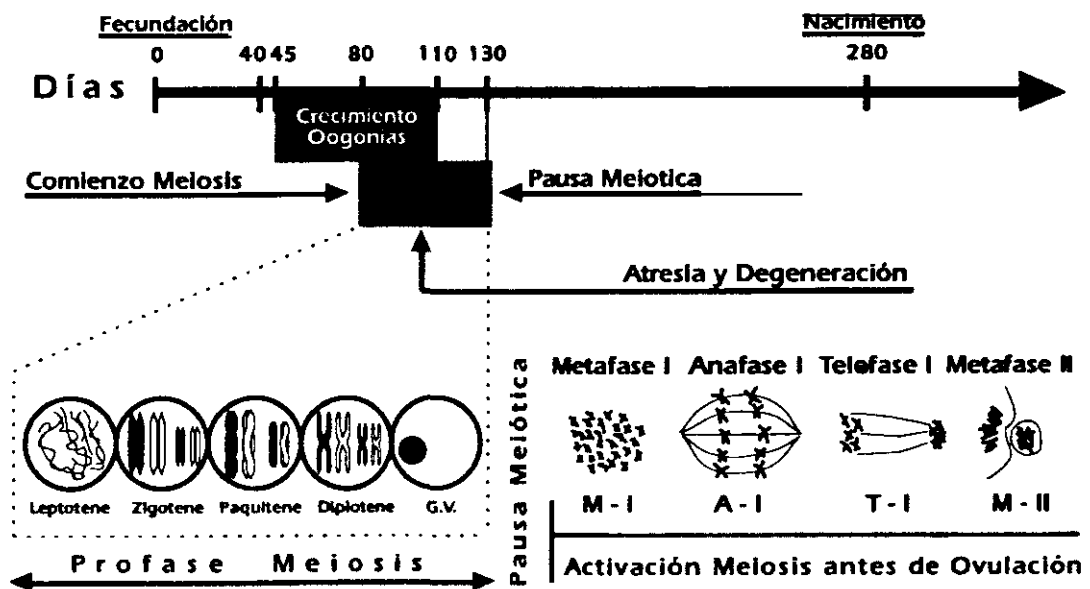
La gametogénesis comienza en la vida intrauterina, entendiendo como tal el proceso que permitirá a una célula llegar a ser el gameto femenino, con plena capacidad de ser fecundado (Baker, 1982; Byskov, 1982). En la gametogénesis es necesario un proceso de reducción cromosómica (ya que la oogonia tiene una dotación cromosómica $2n$ y el oocito la tiene n) y un proceso de crecimiento del propio oocito, al incorporar sustancias nutritivas necesarias para mantener los estadios iniciales del desarrollo embrionario. El proceso de reducción cromosómica se denomina *meiosis* y es *imprescindible* para que el oocito pueda ser fecundado correctamente.

Las oogonias entran en meiosis en la vida intrauterina (Franchi *et al.*, 1962), convirtiéndose en oocitos primarios, a causa de la acción de una sustancia inductora de la meiosis proveniente de las células embrionarias (Baker y Franchi, 1967). La meiosis se detendrá en dos momentos específicos: alrededor del nacimiento y en la ovulación y sólo se completará totalmente al producirse la fecundación del oocito. El proceso meiótico consta de dos divisiones denominadas meiosis I y II, divididas cada una a su vez en cuatro fases: Profase, Metafase, Anafase y Telofase, indicando con los términos I y II su correspondencia a una u otra división.

La meiosis I se inicia con la Profase I y comienza antes del nacimiento (Zuckermann, 1962; Byskov, 1982). La oogonia entra en esta fase que a su vez se

subdivide en otras (leptotene, zigotene, paquitene, diplotene, dictiotene y diacinesis), caracterizadas por amplios cambios del material cromosómico (recombinaciones, sobrecruzamientos etc.). El hecho más importante de la Profase I es, que al llegar al estadio de dictiotene, o dictiato, el oocito detiene tanto la meiosis como su crecimiento, hecho que coincide, generalmente, con el momento del nacimiento (Baker y Franchi, 1967). El estadio de dictiotene se caracteriza por la presencia de un núcleo prominente que recibe el nombre de vesícula germinal (GV) (Franchi *et al.*, 1962). (Véase el Esquema 1).

OOGENESIS EN LA VACA



Esquema 1. Oogénesis en la vaca.

Diversos autores han sugerido que la detención del oocito en dictiato se debe a varios factores: contacto con las células que rodean al oocito (Ohno y Smith, 1964), presencia de un factor que detiene la maduración (MPS) (Byskov, 1982), actuación de células germinales ectópicas de las glándulas adrenales (Zamboni, 1970) o, incluso, cambios de las propiedades de la superficie del oocito.

De esta manera, el ovario de la hembra recién nacida presenta su organogénesis terminada, conteniendo muchos oocitos, detenidos nuclearmente en la primera división de la meiosis (oocitos primarios) y rodeados por el estroma epitelial ovárico formando folículos primordiales (Franchi *et al.*, 1962). Esta cantidad de oocitos será la única fuente de gametos femeninos capaces de ser fecundados en toda la vida de la hembra (de 200.000 a 500.000), aunque de hecho sólo una pequeñísima parte de ellos vayan realmente a ovular.

1.1.3.- Foliculogénesis.

El oocito primario se encuentra rodeado de una pequeña capa de células epiteliales constituyendo el folículo primordial. Por mecanismos no bien conocidos, un pequeño número de folículos primordiales se convierten en folículos primarios, que constan del oocito rodeado de una capa de células cuboides que presentan gran actividad mitótica.

Thibault *et al.* (1987) sostienen que, en este estadio, las células foliculares que rodean el oocito no tienen efecto de inhibición sobre el crecimiento del mismo y, por lo tanto, a partir de entonces y favorecidas por las gonadotropinas hipofisarias, las mitosis de las células epiteliales que rodean el oocito y el crecimiento del mismo, concurren paralelamente. Las células epiteliales se multiplican y crecen disponiéndose en varias capas constituyendo el folículo 2º o pre-antral. Las secreciones de estas células producen mucopolisacáridos, por influencias hormonales, que se dispondrán alrededor del oocito formando una membrana llamada zona pelúcida (ZP).

Mientras todo esto ocurre, el núcleo del oocito sigue en reposo, pero la actividad citoplásmica es intensa, cargándose de productos nutritivos, que son suministrados a través de las células que rodean el oocito. Alrededor del folículo se disponen unas estructuras de tejido conjuntivo que se entrelazan a modo de barrera, constituyendo las tecas, que completarán su formación en el siguiente estadio

folicular. Las células foliculares responden al estímulo de la FSH hipofisaria secretando sustancias (metabolitos, hormonas esteroideas etc.), que se van a acumular en el folículo formando una cavidad llamada antro folicular, lo que constituye el *folículo antral* (Zuckermann, 1962). En el momento en que las células foliculares son capaces de responder al estímulo de la FSH, con síntesis hormonal, se denominan células de la granulosa.

1.1.4.- Maduración del oocito.

La maduración de los oocitos de los mamíferos comprende dos partes: i) un primer periodo de crecimiento y ii) un periodo final de preparación nuclear y citoplásmica, requisito indispensable para una fecundación y desarrollo embrionario normales.

El oocito crecido no tiene todavía la capacidad de secretar las proteínas necesarias para la reactivación de la meiosis (Moore y Linter-Moore, 1974). Cuando el folículo antral alcanza un tamaño determinado (diámetros de 2 mm en el cerdo, Motlik 1989; 1,8 mm en la vaca, Motlik y Fulka, 1986), termina el crecimiento del oocito (145-150 μm en vaca y 120 μm en cerdo, Motlik y Fulka, 1986) y adquiere la capacidad de reanudar la meiosis (este hecho es conocido como "competencia" del oocito).

La *maduración nuclear* incluye la progresión desde el estado de dictiatio hasta la metafase de la segunda división meiótica. La descarga de LH, producida pocas horas antes de la ovulación e inducida por el propio oocito, vía ARN-m, (McGaughey, 1978; Hyttel *et al.*, 1986), activa de nuevo la meiosis, hecho apreciable por la desintegración de la vesícula germinal, sucediéndose las distintas fases meióticas, hasta que tras la extrusión del primer corpúsculo polar, se vuelve a detener la meiosis en la metafase de la 2ª división, coincidiendo con la ovulación.

La *maduración citoplásmica* incluye una sucesión de transformaciones de los orgánulos del oocito, fundamentalmente de mitocondrias (Thibault *et al.*, 1987), gránulos corticales (Cran y Cheng, 1986) y retículo endoplásmico liso y rugoso (Hyttel *et al.*, 1986; Hyttel, 1988), todas ellas necesarias, para el progreso de la maduración y el bloqueo de la poliespermia. Thibault y Gerard (1973) también señalan que se producen proteínas de nueva síntesis, como el *factor del crecimiento del pronúcleo masculino* (MPGF) y el *factor promotor de la maduración* (MPF) (Masui y Market, 1971).

Además de estos fenómenos, se produce también la mucificación y expansión del cúmulo que rodea al oocito (Deckel y Kraisler, 1978; Eppig *et al.*, 1983,) y una pérdida del número de las uniones intercelulares, entre las células granulosas y entre éstas y el oocito (gap-junctions), lo que origina una interrupción en el transporte iónico entre cúmulo y oocito (Thibault *et al.*, 1987; Hyttel, 1988).

Se han propuesto varias sustancias que inhiben la maduración, como el *inhibidor de la maduración de los oocitos* (OMI) (Tsafriri y Channing, 1975), el AMP-cíclico (Deckel y Beers, 1978), el *factor de las células de la granulosa* (GCF) (Sato y Koide, 1984), el GMP-cíclico, fosfatidil-serina, etc.

Los cambios en el oocito y en el folículo preovulatorios son probablemente iniciados por el pico de la hormona luteotropa (LH) (Moor y Warnes, 1979). En la vaca, la ovulación ocurre unas 24 horas después del pico de la LH (Dieleman *et al.*, 1983) y en este periodo de tiempo el oocito bovino completa su maduración, tanto nuclear como citoplásmica (Kruip *et al.*, 1983; Hyttel *et al.*, 1986, 1989).

Después de la ovulación, el oocito sale al oviducto y es transportado, por las células oviductales, hasta el lugar de la fecundación, donde esperará la llegada de los espermatozoides en el estadio de metafase II. La meiosis sólo se reanudará si se produce la fecundación, liberándose, en ese momento, el 2º corpúsculo polar, como señal de haber terminado completamente las dos divisiones del proceso meiótico, como se indica en el siguiente esquema.

Esquema 2. Descripción morfológica de los estadios meióticos durante la maduración de los oocitos bovinos*.

Tiempo* (h)	Estadio meiótico	Descripción morfológica
0	GV	Núcleo intacto. Membrana nuclear presente. A veces el nucleolo. Cromatina a veces condensada.
6-10	GVBD	Desaparición de la vesícula Germinal (Germinal Vesicle Breakdown, GVBD). Desintegración de la membrana nuclear. Visualización de los primeros cromosomas bivalentes.
10-12	DIACINESIS	Los cromosomas están condensados en el lugar del núcleo.
12-16	METAFASE I	Los cromosomas se colocan ordenadamente en la zona ecuatorial formando el huso acromático.
16-18	ANA-TELOFASE I	Los cromosomas se segregación hacia los polos del huso acromático.
19-24	METAFASE II	Cromosomas condensados en el segundo huso acromático y presencia del primer corpúsculo polar.

*Según Kruip *et al.*, (1983) y Hyttel *et al.*, (1986).

*Tiempo en horas tras el pico de la LH.

1.2.- OBTENCION DE OOCITOS.

La obtención de oocitos puede realizarse en diferentes fases de su maduración y mediante diversos sistemas, pudiendo agruparse en dos grandes apartados:

1.2.1.- Oocitos post-ovulatorios.

Son oocitos que han madurado *in vivo* en el propio tracto genital de la hembra. Se localizan en el oviducto poco después de la ovulación.

Normalmente, y con el fin de aumentar el número de oocitos a recoger, se somete a la hembra a tratamientos de superovulación. La obtención a partir del oviducto de los oocitos se efectúa mediante laparotomía o tras el sacrificio de los animales (Brackett *et al.*, 1982).

El intervalo entre la ovulación y la recogida del oocito es muy importante,

ya que los oocitos permanecen fecundables un corto periodo de tiempo de no más de 10-12 horas, pasado el cual pueden sufrir divisiones espontáneas partenogénicas.

1.2.2.- Oocitos pre-ovulatorios.

Son oocitos inmaduros. Hay dos tipos de oocitos pre-ovulatorios, los que casi han completado su maduración y les falta, por lo tanto, un corto espacio de tiempo para terminar la misma y aquellos oocitos foliculares que son totalmente inmaduros.

Los oocitos pre-ovulatorios se obtienen mediante la punción de los folículos ováricos. El grado de maduración de los oocitos recogidos es dependiente del método de recogida empleado;

1.2.2.a.- *Oocitos obtenidos próximos al momento de la ovulación.* En este caso, en el que los oocitos casi han completado su maduración en el propio folículo ovárico, la técnica más utilizada para obtenerlos es la aspiración de los folículos preovulatorios en animales sometidos a tratamientos de superovulación (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). El acceso a los ovarios puede hacerse tras el sacrificio del animal o mediante laparotomía *in vivo* (Greve *et al.*, 1984) o incluso con ayuda de un laparoscópio (Sirard *et al.*, 1985; Lambert *et al.*, 1985). Este es el método empleado desde hace años en los programas de fecundación *in vitro* en la especie humana.

1.2.2.b.- *Oocitos inmaduros,* también se pueden obtener por laparoscopia (Stubbings *et al.*, 1990) o de los ovarios de hembras sacrificadas en matadero, que es la fuente más común de oocitos inmaduros. Por punción y aspiración de folículos antrales de un determinado diámetro, se obtienen los oocitos, que tras varios procedimientos de selección y lavado se introducen en medios de cultivo para su maduración *in vitro*. Empleando oocitos madurados, fecundados y cultivados *in vitro* se han conseguido gestaciones a término en hembras receptoras (vaca: Goto *et al.*, 1988; Pavlok *et al.*, 1992; cerdo y oveja: Cheng *et al.*, 1986).

1.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MADURACION *IN VITRO*.

1.3.1.- OBTENCION DE OVARIOS Y OOCITOS.

1.3.1.a.- Obtención de los ovarios.

Se consiguen de vacas sacrificadas en matadero. Todos los autores están de acuerdo en que su obtención debe realizarse inmediatamente después de la muerte del animal, siendo habitual hacerlo dentro de los 30 minutos siguientes al sacrificio (Leibfried y First, 1979 y 1987; Fukui y Sakuma, 1980; Hyttel *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1987 y 1988; Gordon, 1990; Fukui 1990). La mayor parte de los autores no tienen en cuenta el ciclo estral del animal (Leibfried y First, 1980; Fukui y Sakuma, 1982; Xu *et al.*, 1987; Fukui *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1989 y 1992). El transporte se hace en soluciones salinas-tampón o fosfato-salinas (PBS) con antibióticos (Hyttel *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1989). Además, Moor y Crosby (1985) y First y Parrish (1987), manifiestan la importancia de la temperatura de transporte, ya que por debajo de 30°C está comprometida la capacidad de maduración *in vitro*. Por otro lado, el tiempo que transcurre, desde la recogida de los ovarios hasta el cultivo de los oocitos, debe oscilar entre 2 y 5 horas (Katska y Smorag, 1984; First y Parrish, 1988), aunque Yang *et al.* (1990), indican que después de ocho horas desde la recogida de los ovarios todavía se puede conseguir la maduración *in vitro*, siempre y cuando los ovarios se mantengan por encima de 24°C.

Por otro lado, la edad óptima del animal para obtener oocitos, con vistas a su maduración *in vitro*, no está bien determinada, ya que hay autores que señalan las mismas posibilidades de maduración para los oocitos provenientes de terneras, novillas o vacas adultas desde 3 años en adelante (Katska y Smorag, 1984). Sin embargo, la mayoría de los autores prefieren ovarios provenientes de novillas, puesto que las posibilidades de encontrar folículos atrésicos y oocitos degenerados son significativamente menores que en vacas de más edad (Gordon, 1990).

1.3.1.b.- Selección del folículo.

Según Motlik y Fulka (1986), los folículos menores de 2 mm de diámetro contienen un alto porcentaje de oocitos incompetentes o bien atrésicos, mientras que los mayores de 10 mm presentan un mayor número de oocitos degenerados (Fukui y Sakuma, 1980). Por ello, la mayoría de los autores seleccionan folículos antrales, de diámetros comprendidos entre 2 y 8 mm (Liehman *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1987; Pavlov *et al.*, 1992).

Por otro lado, Lonnergan *et al.* (1992) señalan que los folículos, con un diámetro de entre 2 y 6 mm, permiten una tasa de recuperación de oocitos (nº de oocitos obtenidos/nº de folículos aspirados) aptos para el cultivo mayor que en los folículos de mayor tamaño.

Wurth y Kruip (1992) señalan que los oocitos, procedentes de folículos ligeramente atrésicos, tienen una capacidad normal para madurar *in vitro*, siempre que el cúmulo y el citoplasma no presenten signos claros de degeneración.

1.3.1.c.- Obtención de los oocitos.

El método más común, para recoger oocitos foliculares inmaduros, es la aspiración del contenido folicular, mediante punción de los folículos seleccionados, utilizando para ello agujas estériles, de 18 a 21 G, conectadas a jeringas estériles de 10 ml (Iritani y Niwa, 1977; Xu y Greve, 1988). Otros autores han recogido los oocitos mediante la disección y subsiguiente ruptura de los folículos intactos (Moor y Trounson, 1977; Lu *et al.*, 1987, 1988) aunque según Arlotto *et al.* (1990) los oocitos de folículos que no están situados en la superficie ovárica tienen menores posibilidades de madurar *in vitro*.

El producto de la aspiración se introduce en un tubo cónico para que sedimenten los oocitos (Sirard *et al.*, 1988) o en placas Petri (Newcomb *et al.*,

1978) de donde se recogen. Posteriormente, se pasan varias veces por placas de lavado (Leibfried y First, 1980; Fukui y Sakuma, 1980; Xu *et al.*, 1987; Fukui, 1990) con objeto de eliminar elementos foliculares, que impiden o dificultan la maduración (líquido folicular, células de descamación, sangre, adherencias etc.).

1.3.1.d.- Selección y clasificación de los oocitos.

El estudio de la morfología del oocito ofrece datos sobre su capacidad de iniciar la meiosis y, dado que no se pueden realizar técnicas invasivas que destruirían la célula, deben establecerse criterios, exclusivamente morfológicos, para seleccionar los gametos que garanticen un buen comportamiento en su maduración (Leibfried y First, 1979; Xu *et al.*, 1986; Younis *et al.*, 1989; de Loos *et al.*, 1992).

La selección se efectúa siguiendo dos criterios:

i) *aspecto citoplasmático del oocito*, que según Tsafri y Channing (1975) y Leibfried y First (1979), debe poseer un citoplasma granulado fino y uniforme, sin mostrar espacio perivitelino ni vacuolizaciones.

ii) *aspecto y morfología del cúmulo celular que le rodea*, del que Leibfried y First (1979), Xu *et al.* (1987) y De Loos *et al.* (1992) afirman que no debe encontrarse expandido ni disperso sino compacto y sin aglutinaciones. Laurincknic (1992) señalan que se produce una mayor tasa de maduración *in vitro* cuando se seleccionan oocitos que presentan las células de la corona radiada claramente diferenciadas del resto del cúmulo celular que rodea al oocito.

La clasificación de los oocitos para su cultivo *in vitro* se basa en el número de capas del cúmulo que le rodean. Así, Shioya *et al.* (1988) clasifica los oocitos obtenidos en tres grupos según la compactación del cúmulo. Xu *et al.* (1987) y de Loos *et al.* (1992), los clasifican en cuatro grupos, dividiendo

los oocitos con cúmulo completo en dos tipos, I y II, según la compactación de sus capas. Finalmente, hay autores que dividen los oocitos hasta en 6 grupos (Lonnergan *et al.*, 1991).

1.3.2.- METODOS DE CULTIVO *IN VITRO*.

1.3.2.a.- Medios de cultivo.

Se han formulado una gran cantidad de medios de cultivo cuya composición y finalidad es asegurar el mantenimiento de los requisitos metabólicos y energéticos que el oocito necesita para su maduración fuera del folículo ovárico. De todos los medios utilizados, se puede destacar la utilización del M 199, HAM F-10 y F-12 , TALP, MEM, Medio de Waymouth, etc. Todos ellos son formulaciones complejas de aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, nucleótidos etc., y se utilizan en mayor o menor medida, para los procesos de maduración, fecundación y cultivo *in vitro* por diversos equipos. Los mejores resultados en la maduración *in vitro* se obtienen con la utilización de los medios M-199 (Rose y Bavister, 1992), TALP (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987), HAM F-10 (Xu *et al.*, 1987) y HAM F-12 (Rose y Bavister, 1992) . La importancia del medio de cultivo para la maduración de los oocitos *in vitro* es tal que, según algunos autores, condiciona el éxito de los sistemas de fecundación y el posterior desarrollo *in vitro* de los embriones (Rose y Bavister, 1992).

1.3.2.b.- Modificaciones de los medios de cultivo.

Los medios de maduración se suelen suplementar con sustancias que favorecen la capacidad del oocito para madurar *in vitro*: sueros, sustratos energéticos, hormonas, factores de crecimiento etc. (Las acciones de los dos últimos grupos se describirán más adelante).

1.- **Suero.** El oocito necesita un aporte exógeno de nitrógeno de origen proteico, que no puede formar por sí mismo, por lo que el medio de cultivo se suplementa con suero sanguíneo-Suero Fetal Bovino (SFB) y Suero de Vaca en Estro (SVE), o con alguno de sus derivados como la Albúmina Sérica Bovina (BSA).

Aún cuando ciertos autores han utilizado BSA, en sus medios de maduración (Fukui y Sakuma, 1980), Leibfried-Rutledge *et al.* (1986) indican que se obtienen mejores resultados de maduración al usar el SFB, debido a que el BSA no puede soportar el gasto energético que supone la expansión del cúmulo celular durante la maduración. Eppig *et al.* (1983), señalan además que la suplementación del medio con suero estimula la producción de un factor citoplásmico que favorece la maduración y la fecundación de los oocitos madurados, hecho que no ocurre cuando se adiciona BSA u otro factor que no sea suero. Los sueros, tanto el SFB como el SVE, se inactivan antes de su utilización, a (56°C durante media hora) con el fin de desnaturalizar las proteínas del complemento, ya que éstas pueden causar reacciones inmunes que impiden el desarrollo y crecimiento normal del oocito (New, 1966; Leibfried *et al.*, 1986).

En cuanto al Suero de Vaca en Estro, Sambuisso y Therfall (1989), indican que la composición de este suero cambia debido a las fluctuaciones endocrinas que se producen en este periodo del ciclo estral, modificándose las concentraciones de sustancias que son transferidas al oocito; entre ellas podemos destacar una mayor concentración de LH (Younis *et al.*, 1989). Por otro lado, los mismos autores indican que el suero recogido tras los primeros síntomas del estro (día 20 del ciclo), posee unas propiedades superiores, para la maduración y fecundación *in vitro*, que el suero recogido en días posteriores y Kruip (1988) también señala que el suero recogido a las 8 horas del inicio de los síntomas sicosomáticos del estro es el que contribuye a que los oocitos maduren en mayor número.

Ciertos autores sostienen que el uso de SVE no mejora sustancialmente la maduración *in vitro* con respecto al SFB, aunque sí influye notablemente en el aumento de las tasas de fecundación y desarrollo embrionario *in vitro* (Fukui y

Ohno, 1989); sin embargo Xu *et al.* (1987) y Schellander *et al.* (1990), demuestran que el SVE favorece notablemente la maduración *in vitro*, utilizando concentraciones del 20%, que además, producen expansión completa del cúmulo celular. Pero Kim *et al.* (1990), señalan que la concentración más efectiva, en los sistemas de maduración y fecundación *in vitro*, es del 10% de SVE v/v en el medio de maduración.

2.- Otras sustancias. El oocito, *in vivo*, utiliza el piruvato y el oxalato sódico como compuestos energéticos. Estos compuestos son transferidos, junto con otras sustancias, a través de las uniones intercelulares que le relacionan con las células del cúmulo (Tsafriri y Channing, 1975; De Loos *et al.*, 1992). Al iniciarse la maduración *in vitro*, fuera por lo tanto del entorno folicular, se deben suministrar en el medio de cultivo sustancias que permitan al cúmulo la formación de estos complejos energéticos (Eppig, 1982; Ball *et al.*, 1983).

Habitualmente, los medios se suplementan con piruvato sódico (Tsafriri y Channing, 1975; Sirard *et al.*, 1988; Rose y Bavister, 1992), lactato sódico, glutamina (Lu *et al.*, 1987; Fukui, 1990), glucosa y bicarbonato sódico (Younis *et al.*, 1989). Además, Eng *et al.* (1986), señalan un doble efecto por parte del bicarbonato sódico ya que por un lado mantiene niveles adecuados de pH y, por otro, favorece la síntesis de piruvato sódico en las células del cúmulo.

1.2.3.c.- Condiciones del cultivo *in vitro*.

En un principio, los medios de maduración se basaban en soluciones salinas simples a las que se añadían diversas sustancias con el objetivo de imitar, en todo lo posible, las condiciones a las que el oocito está expuesto en el líquido folicular.

Por otro lado, en los sistemas de maduración *in vitro*, también es necesario controlar las condiciones fisicoquímicas del medio, fundamentalmente en lo referente a la temperatura, osmolaridad, pH, atmósfera gaseosa y duración del cultivo *in vitro*:

Respecto a la *temperatura*, Katska y Smorag (1985) indican que la maduración de oocitos bovinos no se produce 5°C por debajo de la temperatura corporal normal de la especie. Por otro lado, márgenes de temperatura entre 37 y 41°C, permiten la maduración *in vitro* de los oocitos bovinos (Lenz *et al.*, 1983), aunque la temperatura óptima es de 39°C, coincidiendo con la temperatura corporal de la especie (Lenz *et al.*, 1983; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987).

La *presión osmótica* que puede soportar el oocito en los medios de maduración, oscila entre 265 y 325 mOsM. La mayoría de los medios utilizados tienen osmolaridades de 285-295 mOsM, aunque Sato *et al.* (1977) indicaron que los oocitos porcinos y bovinos podían madurar, incluso, con valores de 316-350 mOsM.

Mantener *el pH* del medio constante y a niveles fisiológicos es un factor decisivo, ya que muchos sistemas enzimáticos del oocito bovino sólo actúan a pH muy limitado, inhibiéndose su actividad por debajo de pH 6,7 y por encima de pH 7,6. El pH se regula, en el medio de maduración, gracias a la concentración de CO₂ y de bicarbonato sódico. La variación de pH soportable, en los medios de maduración, oscila entre 6,8 y 7,4, estableciéndose el pH óptimo en 7,2-7,4 (Shea *et al.*, 1976; Sato *et al.*, 1977; Fukui y Sakuma, 1980; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987). Concentraciones de 25 mM de bicarbonato sódico aseguran el mantenimiento del pH, además de proveer un mejor sustrato energético (Eng *et al.*, 1986), aún cuando se pueden utilizar, para este mismo fin, otro tipo de sustancias tampón, como las sales de Hepes (Lu *et al.*, 1987).

La composición de la *atmosfera gaseosa* utilizada para la maduración *in vitro* se considera muy importante, ya que juega un papel decisivo en el control de varias funciones metabólicas y del pH intra y extracelular (Bavister, 1987). Habitualmente se emplean dos tipos de mezclas gaseosas: 5% de CO₂ en el aire (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1987;

Fukui *et al.*, 1982; Wiemer *et al.*, 1991) y 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ (Younis *et al.*, 1989; Pavlov *et al.*, 1990), en ambos casos, con una humedad relativa cercana al 100%. Jones (1979), señala que la presión del CO₂, en el líquido folicular bovino, se sitúa en valores del 5% y además indica que el oocito necesita condiciones anaerobias, para su crecimiento y desarrollo normal. Como ya se ha dicho el CO₂ es regulador del pH junto con el bicarbonato. Hay muy pocos estudios que indiquen las ventajas de incluir en el sistema de maduración una tensión de oxígeno determinada; es más, Gwatkin y Haidri (1973) indican que concentraciones de O₂ del 20% producen la inhibición de la maduración *in vitro* del oocito de hamster, mientras que Tsafri y Channing (1975) señalan que la presencia de altas concentraciones de oxígeno interfieren los procesos de maduración *in vitro*.

La *duración* del cultivo de maduración, hasta alcanzar el estadio de metafase II, en oocitos bovinos, varía según distintos autores: 20-21 horas (Jagiello *et al.*, 1974; Fulka, 1981), 20-24 horas (Suss y Wuthrich, 1985), 24-28 horas (Xu *et al.*, 1986) o incluso 31 horas (Edwards, 1965). La mayoría de los autores establecen un periodo de cultivo de 24 a 27 horas, en el cual consideran completada la maduración *in vitro* (Fukui, 1990).

1.2.3.d.- Sistemas de cultivo *in vitro*.

El gran número de estudios sobre la maduración ha dado lugar a diversas metodologías y modificaciones de las técnicas de cultivo de los oocitos. Fundamentalmente, se tienen en cuenta: el soporte físico sobre el que se va a realizar la maduración (placa, tubo etc), el modo de colocación del medio de cultivo, el número de oocitos por volumen de medio y si el cultivo se realiza de manera estática o con un ligero movimiento.

Sugie *et al.* (1980) señalan dos grupos de sistemas de cultivo: un cultivo en el que no se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera, mediante el uso de un cierre hermético y un segundo tipo de cultivo que se realiza manteniendo un

intercambio gaseoso continuo. El primero no tiene interés ya que no permite el intercambio gaseoso, necesario para la maduración de los oocitos, mientras que dentro del segundo grupo se pueden citar dos tipos: los sistemas abierto y cerrado.

El *sistema abierto* engloba aquellos recipientes en los que se coloca un volumen de medio de cultivo que está en contacto directo con la atmósfera que le rodea. El medio se coloca en placas Petri (Fukui, 1990), cámaras de cultivo (Leibfried y First, 1980; Xu *et al.*, 1988), placas ELISA (Farin y Yang, 1992) o tubos de cristal (Fukui y Sakuma, 1980). El inconveniente de este sistema es que presenta una gran superficie de evaporación, lo cual puede originar un aumento de la osmolaridad, al elevarse la concentración de sodio.

El *sistema cerrado* consiste en recubrir el medio de cultivo con aceites minerales, de tal manera que se impida la evaporación del medio pero se permite el intercambio gaseoso con la atmósfera. El modo más corriente de efectuar este tipo de cultivo es el de las "microgotas" (Brinster, 1970). Consiste en colocar un determinado número de gotas, habitualmente con un volumen de 50 ó 100 μ l, en una placa Petri y recubrirlas, posteriormente, con aceite de parafina o silicona. El agua no se evapora fácilmente, pero alguno de los componentes del medio puede ser soluble en aceite; por ello, hay que equilibrarlo, antes de iniciar el periodo de cultivo (Whitten, 1971). El sistema de microgotas permite una identificación individual de los oocitos, minimiza los riesgos de contaminación y facilita el cultivo independiente de los oocitos y una observación de los mismos más fácil que con otros sistemas.

En cuanto al *número de oocitos* que pueden colocarse en el medio, los autores que utilizan el sistema abierto ponen un número de 20-30 oocitos/ml de medio (Fukui, 1990; De Loos *et al.*, 1992) mientras que con el sistema de microgotas, se colocan de 5 a 10 oocitos por microgota (Shioya *et al.*, 1988; Rose y Bavister, 1992).

Diversos autores han indicado una cierta ventaja cuando se somete la placa

de cultivo a una ligera oscilación constante durante el periodo de maduración. Este movimiento tiene por objeto favorecer la difusión de los componentes del medio y, sobre todo, de las hormonas (Musse, 1990; Pavlov *et al.*, 1992).

1.3.2.e.- Sustancias foliculares en la maduración *in vitro*.

Los oocitos de los mamíferos pueden sufrir la maduración nuclear cuando se aíslan del folículo ovárico y son cultivados *in vitro* en condiciones adecuadas (Pincus *et al.*, 1935; Edwards, 1965). Para ello, el oocito tiene que liberarse de la influencia del líquido folicular y de las células de granulosa que, *in vivo*, le mantienen en la pausa meiótica, hasta que se produce el pico preovulatorio de la LH. De esta manera, la adición de estos componentes foliculares en los medios de maduración *in vitro*, puede influir positiva o negativamente en la maduración del oocito (Wassarman, 1988).

1.- Líquido folicular. Algunos autores (Chang, 1955; Sreenan *et al.*, 1970), señalan que la adición de líquido folicular (LF), al medio de maduración, inhibe la meiosis en oocitos de coneja y vaca. Tsafiriri y Channing (1975) describen una sustancia proteica, de 2000 Da de peso molecular, presente en el LF porcino. Este compuesto, denominado OMI (*inhibidor de la maduración del oocito*) provoca la inhibición de la maduración *in vitro* de los oocitos, aunque este efecto es reversible si se añade LH al medio. El OMI no es específico de especie, ya que LF de distintas especies inhiben la maduración de los oocitos de otras y, además, actúa solamente a través de las células del cúmulo (Tsafiriri y Bar-Ami, 1982). Por otro lado, la presencia y acción del OMI son muy discutidas, debido a la falta de una base bioquímica clara que demuestre su existencia (Leibfried y First, 1980). Además, se ha demostrado recientemente que la hipoxantina y adenosina, presentes en el LF, se comportan también como inhibidores de la maduración *in vitro* (Sirard *et al.*, 1992).

Estudios posteriores demuestran que sólo pequeñas fracciones del LF inhiben realmente la maduración *in vitro*; estas fracciones pueden presentar productos de

bajo peso molecular (Tsafriri y Channing, 1975), péptidos pequeños (Sato y Koide, 1984) o nucleótidos (Downs *et al.*, 1989). Leibfried y First (1980) indican que el LF filtrado y esterilizado provoca sólo una leve inhibición temporal en la maduración cuando se añade al medio en una proporción del 50% v/v. Sirard y First (1988) demuestran que hay una relación dosis-respuesta al añadir LF al medio, estableciéndose una inhibición patente de la maduración del oocito con concentraciones superiores al 50% de LF v/v.

Sirard *et al.* (1992) señalan que el efecto inhibitor, sobre el oocito, se ejerce por sustancias presentes en el propio LF y que este efecto se hace a través de las células del cúmulo.

En general, existe una discrepancia sobre el papel inhibitor o estimulador ejercido por el LF. La adición de LF porcino dializado (mediante membranas de separación de 6000 a 8000 Da, de diámetro del poro) provoca un aumento del número de oocitos madurados y fecundados *in vitro*, en esta especie animal (Naito *et al.*, 1988). Ello puede ser debido a varias causas, citando sólo dos, como las más importantes: a) que las técnicas de filtrado y esterilizado del LF eliminan los compuestos inhibidores (OMI u otros) y b) que las sustancias inhibitoras de los folículos de donde se extrae el LF, no presenten ya ninguna actividad negativa, sobre la maduración *in vitro*.

Recientemente, Romero *et al.* (1992) señalan que el LF bovino obtenido del folículo dominante presenta una sustancia estimulante de la maduración del oocito, con un p.m. de 100.000.

2.- Células de granulosa. Las células de la granulosa se encargan *in vivo* de mantener la pausa meiótica del oocito (Dekel, 1989), hasta la llegada de los cambios, en los niveles endocrinos, que culminan con la ovulación. Sin embargo, hay autores que han demostrado que la adición de ciertas cantidades de células de la granulosa, al cultivo de maduración *in vitro*, ofrece efectos positivos tanto sobre la maduración como sobre la fecundación *in vitro*. Este efecto beneficioso se ha

demostrado en varias especies animales, como en la cerda (Motlik y Fulka, 1986), oveja (Staigmiller y Moor, 1989) y vaca (Critser *et al.*, 1986; Fukui, 1990).

Las células de la granulosa se obtienen de folículos antrales, con un tamaño comprendido entre 10 y 20 mm de diámetro (Fukui y Ono, 1989) y se cocultivan con los oocitos a una determinada concentración. Así, la mayoría de los autores establecen cantidades de 1-7 millones de células/ml de medio de maduración (Xu *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1992). Sirard *et al.* (1992) indican que cocultivos, con un número superior a 15 millones/ml de células granulosas en el medio, producen efectos inhibidores en la maduración, debido, probablemente, a la acumulación de un factor inhibidor, el GCF (*factor de la células de granulosa*), descrito por Sato y Koide (1984).

1.2.3.f.- Reguladores de la maduración *in vitro*.

Las hormonas y el sistema del AMPc, entre otros factores, participan activamente en el control de la maduración del oocito, tanto *in vivo* como *in vitro* (Channig y Tsafiriri, 1977; Fukui y Ono, 1989; Eppig, 1989).

1.- Hormonas. En el folículo ovárico en crecimiento, se producen cambios regidos por la secreción y actuación de las gonadotropinas, esteroides, factores de crecimiento y otras moléculas. Cada una de ellas, individual o colectivamente, actúan para conseguir la correcta maduración del oocito. La suplementación del medio de maduración de oocitos bovinos, con gonadotropinas y esteroides, ha demostrado tener un efecto positivo en la maduración de los oocitos *in vitro* en todas las especies (Leibfried y First, 1980; First y Parrish, 1987).

1.a.- Gonadotropinas. La adición de gonadotropinas aumenta las tasas de maduración en diversas especies animales: hamster (Gwatkin y Andersen, 1976), coneja (Thibault y Gerard, 1973), oveja (Moor y Trounson, 1977), cerda (Yoshida *et al.*, 1992) y vaca (Thibault *et al.*, 1975b; Fukushima y Fukui, 1985; Zuelke *et al.*, 1989).

La hormona luteinizante (LH) ha demostrado tener efectos positivos en los sistemas de maduración *in vitro*. Shalgui *et al.* (1979) indican que la LH mejora la maduración citoplásmica del oocito; Zuelke y Brackett, (1990) señalan que la presencia de LH, en el medio de cultivo *in vitro*, provoca una mayor oxidación mitocondrial de la glucosa, en los oocitos bovinos, lo cual favorece la maduración de los mismos.

La hormona folículo estimulante (FSH) también ha demostrado inducir la maduración en oocitos de rata (Tsafriri, 1978), coneja (Thibault y Gérard, 1973) y vaca (Hensleig y Hunter, 1985; Süss *et al.*, 1988). Sin embargo, muchos autores indican que la FSH no es imprescindible para la maduración nuclear del oocito pero tiene influencia en la expansión del cúmulo celular (Sato *et al.*, 1978; Leibfried y First, 1979; Fukui *et al.*, 1982). La combinación de FSH y LH también puede estimular la expansión del cúmulo celular y la maduración en oocitos bovinos (Suss *et al.*, 1988). Sin embargo, Armstrong *et al.* (1991) señalan que la adición de una, otra o ambas gonadotropinas, a los medios, llevan a cabo un efecto distinto, dependiendo del estado de maduración de las células del cúmulo, ya que, según este estado, las células presentan un número mayor o menor de receptores para la LH o para la FSH y, por lo tanto, responden de distinta manera según la hormona empleada en los medios.

La gonadotropina coriónica humana (hCG) se ha utilizado en los medios de maduración en lugar de la LH, ya que presenta acciones similares a esta última (Hensleigh y Hunter, 1985; Xu *et al.*, 1986).

El mecanismo mediante el cual las gonadotropinas actúan sobre la maduración no está aún claro. Se ha postulado que esta acción se lleva a cabo por alguna o algunas de estas dos vías: por señales específicas que llegan al oocito por medio de la expansión del cúmulo o porque estas hormonas están relacionadas con la activación del factor promotor de la maduración (MPF), también a través de las células del cúmulo (Motlik, 1989).

1.b.- Esteroides. Las acciones que ejercen estas hormonas en el proceso de maduración *in vitro* no son aún bien conocidas del todo, aunque se sabe que el pico de la LH conduce *in vivo* a un aumento de estrógenos, en el folículo preovulatorio. Sin embargo, cuando se añaden esteroides a un medio de maduración de oocitos *in vitro*, algunos autores no describen cambios importantes en la maduración de oocitos de vaca, rata y cerda (Tsafriri, 1978; Lu y Gordon, 1987; Gordon, 1990).

Los esteroides más utilizados en los medios de maduración son el *estradiol* y la *progesterona*, describiéndose que la adición de ambos completa la maduración nuclear y citoplásmica (Fukui *et al.*, 1982). El estradiol por sí solo parece no afectar a la maduración nuclear del oocito (Younis *et al.*, 1989), pero sí influye en la maduración citoplásmica y sobre todo en la fecundación. Por otro lado, la presencia de este esteroide, en el medio de maduración, se considera un factor importante para la formación del pronúcleo masculino (Thibault *et al.*, 1975; Fukui *et al.*, 1982; Thibault, 1987), aunque hay autores que indican que una suplementación exclusiva con estradiol, durante la maduración, puede provocar anomalías cromosómicas (Kruip *et al.*, 1983).

La progesterona demuestra tener un efecto estimulante en la maduración de oocitos de coneja, cuando se añade a los medios de cultivo (Bae y Foote, 1975). Sin embargo, sobre los oocitos bovinos no se describe ningún efecto positivo (Fukushima y Fukui, 1985). Otros esteroides (testosterona, androstenodiona, etc.) han sido poco estudiados y no han demostrado ningún efecto apreciable sobre la maduración *in vitro*, en las concentraciones y especies estudiadas (Smith y Tenney, 1980). Por otro lado, Osborn y Moor (1983) indican que para mejorar la maduración en oocitos de oveja es preciso un equilibrio en las concentraciones de las hormonas esteroides añadidas al medio, sobre todo del estradiol y la progesterona.

La variedad de los efectos descritos por la adición exógena de hormonas en los medios de maduración de oocitos *in vitro* es tan grande que, incluso, hay autores que señalan que el tipo de acción hormonal depende del medio de cultivo empleado (Fukui *et al.*, 1982). En cualquier caso, estos autores señalan que la acción que

ejercen las hormonas esteroideas, en la maduración *in vitro* en general, es debida a modificaciones o incorporaciones de nuevas proteínas al oocito.

Por último, otros autores destacan incluso que cuando los medios de maduración se suplementan con hormonas, éstas no tienen los efectos esperados sobre la maduración y la fecundación e indican que la adición de SVE presenta mejores resultados (Gordon, 1990). Probablemente, esto sea debido a que, en este suero, las hormonas se presentan a concentraciones similares a las fisiológicas, cosa que no ocurre al añadirlas exógenamente en los sistemas de maduración *in vitro* (Lu y Gordon 1987; Lu *et al.*, 1987; Gordon, 1990; Schellander *et al.*, 1990).

1.c.- Otras hormonas. Además de las hormonas citadas anteriormente, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y sus agonistas han demostrado estimular la maduración de oocitos en rata (Hillensjo y Maire, 1980). Por otro lado, estudios recientes indican que la hormona estimulante del tiroides (TSH) puede influir en la posible regulación de la maduración, ya que su adición a medios de maduración *in vitro* aumenta la expansión del cúmulo y la tasa de maduración en oocitos bovinos (Younis y Brackett, 1992).

La prolactina (PRL) se añade a los medios de maduración de oocitos de algunas especies: oveja (Vázquez *et al.*, 1990) y cerda (Illera, 1992). Sin embargo, sobre el oocito vacuno no presenta, hasta el momento, ningún efecto ni en la maduración, ni en la fecundación *in vitro* (Saeki *et al.*, 1990; Younis y Brackett, 1992).

2.- Sistema AMPc. Desde hace algunos años, se admite que el sistema que regula los niveles de adenosín mono fosfato cíclico (AMPc), en el interior del oocito, es el encargado de mantener su núcleo en reposo meiótico (GV). Esto es así, al menos en animales de laboratorio (Downs *et al.*, 1989) y parece que el AMPc juega el mismo papel, aunque no de manera exclusiva, en otras especies (Moor y Gandolfi, 1987; Sirard *et al.*, 1990). En este mecanismo de regulación parecen actuar varios factores cuyas acciones se describen seguidamente.

Hay dos enzimas que actúan aumentando a disminuyendo las concentraciones del AMPc. La *adenilato-ciclasa* origina una elevación de los niveles del AMPc intracelular, mientras que la *fosfodiesterasa* (PDE) actúa disminuyéndola.

Por lo tanto, cuando se añaden, al medio de maduración, agentes que estimulan la actividad de la adenilato-ciclasa o sustancias que inhiben la acción de la PDE, aumentan los niveles intracelulares de AMPc en el oocito. Entre los primeros, el forskolín (Sato y Koide, 1984) y entre los segundos, la isobutilxantina (Dekel y Beers, 1980; Sirard *et al.*, 1990).

De la misma manera, todos los análogos estructurales del AMPc, como el dibutilil AMPc (dbcAMP) o el 8-bromo AMPc también inhiben la activación de la meiosis (GVBD) (Sirard *et al.*, 1992).

El mecanismo intrínseco del proceso de desactivación y activación meiótica es la regulación ejercida por una protein-quinasa (PKC), la cual fosforiliza una proteína desconocida. Esta proteína es la encargada de mantener la pausa meiótica (GV). Todo este proceso depende de las concentraciones de AMPc. Cuando bajan los niveles intracelulares de AMPc en el oocito también disminuyen los de PKC, y la proteína se desfosforiliza, lo cual da como resultado la activación meiótica del oocito (GVBD) (Bonslaeger *et al.*, 1986). Parece lógico decir que la disminución de los niveles intracelulares de AMPc, en el oocito, es la señal de la reactivación meiótica, tanto *in vivo* como *in vitro* (Dekel y Beers, 1980).

Sanbuissho *et al.* (1992) hablan de la paradoja que supone el que la bajada de las concentraciones de AMPc inicien la meiosis, mientras que las gonadotropinas, que se comportan como estimuladores de la producción de AMPc en el cúmulo celular, también favorezcan la reentrada en meiosis. La explicación que dan estos autores, a esta aparente contradicción, es que los altos niveles de AMPc, inducidos por las gonadotropinas, rompen las uniones intercelulares en el cúmulo y con el oocito y, en consecuencia, el flujo de AMPc se interrumpe activándose la meiosis.

Por otro lado, se ha observado, en el oocito bovino y en el de oveja, que las altas concentraciones de AMPc intracelulares no son las únicas encargadas de mantener la detención meiótica. Los análogos del AMPc y los otros inhibidores de la meiosis anteriormente citados, sólo pueden inhibir temporalmente la maduración o bloquearla, en el estadio de Metafase I (Ball *et al.*, 1984; Moor y Gandolfi, 1987).

De hecho se ha descrito que, además del AMPc, moléculas como la hipoxantina y la adenosina, presentes en el líquido folicular de oocitos inmaduros, ejercen también un efecto inhibitor sobre la activación de la meiosis del oocito (Downs *et al.*, 1985). Estas purinas tienen un efecto inhibitor débil sobre los oocitos de vacuno, al contrario de lo que ocurre en los murinos (Sirard y First, 1988).

El mecanismo que produce la inhibición de la maduración parece diferente en rumiantes del de otras especies, ya que aunque el AMPc ejerce una influencia importante, no es el único encargado de esta función y son las células del cúmulo las encargadas de regular estos efectos (Moor y Gandolfi, 1987). Sustancias como el OMI (Tsafriri y Channing, 1975), GCF (Sato y Koide, 1984) o alguna sustancia similar al MIS pueden inhibir también la maduración. Por todo ello, se asegura que sobre los oocitos bovinos hay múltiples factores que se combinan para mantener la detención meiótica.

1.3.3.- DESCRIPCION DEL OOCITO. CRITERIOS DE MADURACION.

El oocito inmaduro presenta una morfología, definida y característica, que sufrirá importantes cambios a lo largo del proceso de maduración. Dichos cambios morfológicos se demuestran utilizando técnicas de tinción por microscopía óptica o electrónica (Edwards, 1965; Xu *et al.*, 1986; Hyttel *et al.*, 1986; de Loos *et al.*, 1992).

1.3.3.a.- Morfología del oocito inmaduro. El oocito, aislado de su folículo,

presenta un núcleo grande, situado periféricamente, rodeado de la membrana nuclear y con un nucleolo apenas visible, en los oocitos bovinos (Hyttel *et al.*, 1986; de Loos *et al.*, 1992). Este estado nuclear se corresponde con el estadio de dictiatio meiótico (GV).

Los orgánulos citoplásmicos se distribuyen por todo el citoplasma de la célula y así las mitocondrias se localizan en la periferia, mientras que en posición central se encuentran gránulos corticales, retículo endoplásmico rugoso (REr), aparato de Golgi y vesículas lisosomales (Kruip *et al.*, 1983).

El espacio perivitelino (EPV) no existe o es muy pequeño y la zona pelúcida se encuentra atravesada por las prolongaciones de las células de la corona radiada, constituyéndose como uniones intercelulares ("gap junctions"). Estas uniones llegan incluso hasta el interior del oocito y sirven como "puente" de unión entre éste y las células del cúmulo que le rodean y, también entre ellas mismas. Estas vías de comunicación celular pueden ocupar hasta el 1% de la superficie total de la membrana plasmática del oocito (Moor y Gandolfi, 1987).

El oocito inmaduro presenta el cúmulo celular compacto e incluso dificulta la visión del propio oocito (Leibfried y First, 1979).

1.3.3.b.- Morfología del oocito durante la maduración. El inicio de la maduración está marcado por cambios nucleares y citoplásmicos que ocurren en periodos de tiempo distintos según, la especie. En oocitos bovinos, entre las 3 y 6 horas del comienzo de la maduración, comienzan los cambios en el núcleo del oocito que culminan con la desaparición de la membrana nuclear (GVBD). De 12 a 16 horas, se llega al estadio de metafase I (Xu *et al.*, 1986) y de las 19 a las 24 horas se produce la extrusión del primer corpúsculo polar al EPV, llegando rápidamente al estadio de metafase II, donde se detiene nuclearmente la meiosis, en espera de que ocurra la fecundación (Xu *et al.*, 1986; Hyttel *et al.*, 1986; Hyttel, 1988; Sirard, 1989).

Los cambios citoplásmicos a lo largo de este periodo se resumen en una elevada actividad de síntesis proteica y una reordenación de los sistemas de microtúbulos, debido a la intensa actividad cromosómica (Hyttel *et al.*, 1986). Además, también existe un agrupamiento de las mitocondrias y los gránulos corticales que comienzan a situarse periféricamente (Ducibella *et al.*, 1988).

Por lo que respecta a las uniones intercelulares, comienzan a retraerse a las 3 horas de iniciada la maduración (Hyttel *et al.*, 1987) y a las 18 horas sólo quedan restos de las mismas en el EPV, quien a la vez que progresa la maduración, se hace cada vez mayor (Xu *et al.*, 1986).

Entre las 10 y 12 horas, del comienzo de la maduración, el cúmulo que rodea el oocito comienza su expansión, que llega a ser máxima a las 18 horas del inicio del cultivo (Hyttel *et al.*, 1986). La expansión se debe a la mucificación entre las células, por la presencia de ácido hialurónico en la matriz intercelular y, también, a la posible presencia de un factor desconocido que favorece la expansión y que se transfiere desde el mismo oocito hasta el cúmulo (Buccione *et al.*, 1990).

1.3.3.c.- Morfología del oocito maduro. Se caracteriza por la expansión total del cúmulo celular y por la presencia del primer corpúsculo polar en el EPV (Leibfried y First, 1979; Xu *et al.*, 1986). A nivel nuclear, los cromosomas presentan la configuración de metafase II.

Los cambios citoplásmicos no se completan hasta las 30 horas de haber comenzado la maduración, aunque nuclearmente la maduración finaliza a las 24 horas (Hyttel, 1988). Estos cambios citoplásmicos incluyen, sobre todo, dos procesos: la colocación de los gránulos corticales a la periferia, situándose bajo la membrana plasmática (Ducibella *et al.*, 1988), y el agrupamiento de mitocondrias y RER en cisternas de gran tamaño (de Loos *et al.*, 1992). En esta fase final de la maduración, sigue existiendo una alta actividad de síntesis proteica con el fin de preparar al oocito, nuclear y citoplásmicamente, para la fecundación (Moor y Gandolfi, 1987; de Loos *et al.*, 1992).

Estos fenómenos cronológicos, descritos en la maduración se corresponden tanto en los oocitos madurados *in vivo* como *in vitro* (Kruip *et al.*, 1983; Hyttel, 1988). Las diferencias más notables entre ambos tipos de maduración, estriban fundamentalmente en que los oocitos madurados *in vitro* sufren por un lado, un retraso en la migración de los gránulos corticales a la periferia del oocito (Cran, 1989; Hyttel *et al.*, 1986) y por otro, presentan un mayor número de prolongaciones celulares, provenientes de las células de la corona radiada, en el EPV (de Loos *et al.*, 1992).

Por lo tanto, los criterios que aseguran que ha ocurrido la maduración *in vitro* pueden resumirse en:

- 1) Extrusión del primer corpúsculo polar y llegada al estadio de metafase II.
- 2) Expansión y mucificación del cúmulo celular.
- 3) Traslado de los gránulos corticales a la periferia del oocito (Ducibella, 1988; Cran, 1989; Buccione *et al.*, 1990).
- 4) Desaparición de las uniones intercelulares (de Loos *et al.*, 1992).

Aunque estos criterios de maduración son aceptados por la mayoría de los autores, todos ellos están de acuerdo en que el mejor criterio de una correcta maduración es comprobar la capacidad del oocito para ser fecundado y seguir su desarrollo embrionario de una manera completamente normal (Hyttel, 1988; Younis *et al.*, 1989; de Loos *et al.*, 1992).

2.- FECUNDACION.

2.1.- TRANSPORTE DE LOS GAMETOS.

Cuando se produce la ovulación *in vivo*, el oocito sale del folículo y cae en las fimbrias del oviducto por donde se desplaza hacia el lugar de fecundación, gracias al movimiento ciliar de las células oviductales y a las contracciones peristálticas de la capa muscular (Blandau *et al.*, 1976). Por su parte, los gametos masculinos, depositados en la vagina, se desplazan también por el tracto genital de la hembra hacia el lugar de la fecundación.

2.1.1.- Transporte del gameto femenino. Yang y Yanagimachi (1989) indican que durante el transporte del oocito y mientras espera el momento de la fecundación, todavía se pueden producir modificaciones en el citoplasma, en la zona pelúcida y en el cúmulo celular. En el caso de la vaca, las capas externas del cúmulo desaparecen prácticamente de 9 a 14 horas después de la ovulación, aunque la vida fértil del oocito todavía pueda dilatarse hasta 10 horas más (Thibault, 1966). Este tiempo es extremadamente largo comparado con lo que ocurre en otras especies animales (McLaren, 1980).

En cualquier caso, el envejecimiento del oocito está relacionado con la disminución de la capacidad fecundante. Este envejecimiento conduce a que se produzcan anomalías en la fecundación (como la poliespermia) o a la degeneración del propio oocito (Yanagimachi y Chang, 1961; Hunter, 1980).

2.1.b.- Transporte del gameto masculino. Los espermatozoides eyaculados y depositados en la vagina ascienden por el tracto genital de la hembra hacia el lugar de la fecundación gracias a las contracciones musculares del útero, inducidas por la cópula. El gran número de espermatozoides, liberados tras la eyaculación, disminuye a la vez que se seleccionan por su paso a través del tracto genital femenino. En la vaca, la mayor selección ocurre a nivel de la unión utero-tubal (McLaren, 1980).

Durante el paso por el tracto femenino, los espermatozoides se liberan del plasma seminal que les acompaña en el momento de la eyaculación (Yanagimachi, 1988).

Harper (1988), señala que el tiempo de llegada hasta el lugar de la fecundación es muy variable, y en concreto, los espermatozoides de toro se pueden encontrar en dicho lugar entre los 2 y 13 minutos, tras el coito. Por otro lado, cierto número de espermatozoides de toro y de otras especies detienen su progresión en la porción caudal del istmo del oviducto, liberándose de manera gradual hacia el lugar de la fecundación. De esta manera, el istmo oviductal se comportaría como una especie de reservorio espermático (Hunter y Wilmut, 1984).

El tiempo de supervivencia del espermatozoide en el interior del tracto femenino es muy variable, proponiéndose para el espermatozoide de toro una vida fértil de hasta 48 horas (Hafez *et al.*, 1980). Todos los sistemas de transporte de los gametos, están controlados por un gran número de mecanismos fisiológicos, entre los que destacan los siguientes:

En primer lugar, las hormonas esteroides (en particular el estradiol y la progesterona) juegan un papel importante sobre la contracción y secreción oviductal, gracias a los receptores que existen en el tejido del oviducto para estas hormonas (revisado por Harper, 1988).

En segundo lugar, intervienen una serie de sustancias como ciertas catecolaminas (norepinefrina y epinefrina), prostaglandinas (PGF_{2α} y PGE₁), ciertos péptidos (péptido intestinal vasoactivo), nucleótidos cíclicos (AMPc) y neurotransmisores (GABA). Todas ellas controlan, en parte, el transporte de los gametos a través del oviducto (Harper, 1988).

Sin embargo, el espermatozoide, al contrario de lo que ocurre con el oocito, necesita aún unos procesos que le permitan fecundar el gameto femenino. El conjunto de estos procesos se denomina capacitación espermática.

2.2.- CAPACITACION ESPERMATICA.

Después de abandonar los testículos, los espermatozoides de los mamíferos sufren dos procesos antes de lograr la penetración dentro del gameto femenino. Uno está referido a los cambios de maduración que sufre en el epidídimo y el otro a modificaciones que se llevan a cabo en el tracto genital femenino. Todo ello se conoce genéricamente con el nombre de capacitación.

Austin (1951) indica que el espermatozoide debe sufrir algún proceso, antes de penetrar en la zona pelúcida del oocito y que éste ocurre en el tracto genital de la hembra. Algunas semanas más tarde, Chang (1951) publica una conclusión idéntica. Por lo tanto, la capacitación consiste, al menos en parte, en la retirada gradual del material que recubre la región acrosómica del espermatozoide. De esta manera, se dejan libres los receptores de los espermatozoides para que puedan interaccionar con las sustancias del oviducto, las capas externas del cúmulo celular o con los propios receptores que posee la zona pelúcida del oocito.

La capacitación consta de dos fases, una alteración espermática inicial, a la que sigue una *fusión de la membrana acrosomal externa con la membrana plasmática* del espermatozoide, denominada reacción acrosómica (Yanagimachi y Usui, 1974; Yanagimachi, 1981). El fenómeno de la capacitación está muy extendido en todo el reino animal, aunque la reacción acrosómica es un patrimonio casi exclusivo de los mamíferos (Yanagimachi, 1988). Todo este conjunto de procesos que sufre el espermatozoide comienza en el oviducto, continúa a través del paso por el cúmulo celular y finaliza en la misma zona pelúcida del oocito (Wassarman, 1988).

Yanagimachi (1988) señala que las sustancias integradas en la membrana plasmática del espermatozoide, durante su etapa de maduración en el epidídimo, impiden la capacitación espontánea. De la misma manera parecen actuar ciertos componentes del plasma seminal que acompaña al eyaculado. Algunos autores denominan a este conjunto de sustancias como "factores decapacitantes". De hecho, durante la maduración epididimal, la morfología acrosomal cambia con respecto a

las etapas anteriores. A su vez, se incorporan nuevas macromoléculas o se modifican las ya existentes; entre éstas, destaca la integración o modificación de glicoproteínas acrosómicas por parte de enzimas presentes en el líquido epididimal, como la galactosil-transferasa.

Bedford (1969) señala que las regiones del tracto genital femenino difieren en su potencial, para capacitar el espermatozoide. Mientras que la capacitación puede tener lugar en el útero (Austin, 1951), se produce más rápidamente cuando sucede en el oviducto (Bedford, 1969). Además, la capacitación espermática varía según el estado endocrino de la hembra, ya que altos niveles de estrógenos plasmáticos favorecen la capacitación, mientras que elevadas concentraciones de progesterona la inhiben. De acuerdo con esto, Anderson *et al.* (1992) señalan que en el momento del estro se produce en el oviducto una proteína desconocida que favorece la capacitación del espermatozoide bovino. Por otro lado, Herz *et al.* (1985) señalan que el espermatozoide de toro sufre la reacción acrosómica en la ampolla del oviducto ipsilateral del ovario que ha ovulado, en la mayoría de las ocasiones, y que además se produce en un momento cercano o justo después de la ovulación.

Aunque los factores que inducen la capacitación en el tracto genital femenino no son del todo conocidos, se sabe, desde hace tiempo, que no son específicos de especie, aunque la duración mínima para que suceda la capacitación sí que lo es, permaneciendo constante tanto *in vivo* como *in vitro*. Ya que la vida útil o fértil de ambos gametos es limitada, en el tracto genital femenino, parece ser que la capacitación está relacionada con la ovulación. Bedford (1969) señala la posible existencia de un factor que induce la reacción acrosómica, procedente del propio oocito. Aunque los mecanismos precisos de la capacitación todavía siguen sin descubrirse completamente, se han postulado ciertas teorías de acuerdo a los experimentos realizados en diversas especies animales. Según éstos, los cambios producidos en la membrana del espermatozoide durante la capacitación incluyen cambios en las propiedades de las membranas espermáticas, aumento del pH acrosomal (de 7,4 a 7,8), alteraciones en la proporción entre el colesterol y los

fosfolípidos, aumento de la permeabilidad a los iones de calcio, interacción con glicosaminoglicanos y, por último, la reacción acrosómica (Yanagimachi, 1988; Fayrer-Hoskens y Caudle, 1991).

Reacción acrosómica (RA).

In vivo el oocito pierde gran parte de las células del cúmulo, después de la ovulación o en su recorrido por el oviducto (Crozet, 1984). Por lo tanto, el espermatozoide al acercarse al oocito contacta íntimamente con las pocas células del cúmulo que quedan y con la superficie de la zona pelúcida. En este momento se produce la RA.

La RA consta, fundamentalmente, de una serie de puntos: fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa, dispersión de la matriz acrosomal y exposición de la membrana acrosomal interna, la cual se constituye en una membrana de superficie (Hytel *et al.*, 1987). Yanagimachi (1988) indica que la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa se produce en diversos puntos, formándose unas vesículas con membrana mixta que se desprenden de la cabeza espermática. El resultado de esta fusión de membranas es la liberación del contenido del acrosoma, cuya composición enzimática es la siguiente:

Enzimas presentes en el acrosoma (Yanagimachi, 1988).

Hialuronidasa	Arilaminidasa
Acrosina.	β -N-acetilhexosaminidasa
Proacrosina	β -Galactosidasa
Esterasas	β -Glucuronidasa
Neuroaminidasas	L-Fucosidasa
Fosfatasas	Fosfolipasa C
Fosfolipasa A	Petidil-peptidasa
Arilsulfatasa	Ornitina-decarboxilasa
Colagenasa	

La RA es un requisito indispensable para que se pueda producir la

penetración del espermatozoide en el interior del oocito, ya que para ello se necesita la liberación de las enzimas acrosomales (Talbot, 1985).

Bleil y Wassarman (1983) señalan que la zona pelúcida contiene unas glicoproteínas denominadas, genéricamente, "ZP", de las que hasta el momento se han aislado tres tipos: ZP₁, ZP₂ y ZP₃, que se comportan como responsables de los fenómenos de reconocimiento espermático. En concreto, la ZP₃ es la molécula responsable no sólo de la unión de la zona pelúcida del oocito con el espermatozoide, sino de inducir en éste la reacción acrosómica (Wassarman, 1988). Estos mismos autores indican que sólo los espermatozoides con el acrosoma intacto se unen a la zona pelúcida. El mecanismo por el que se induce la RA no está aclarado del todo pero se cree que la unión espermatozoide-ZP₃ provoca una mayor permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide al calcio extracelular (Wassarman, 1988). Roldán *et al.* (1992) aclaran, en parte, este mecanismo indicando que la unión de la ZP₃ con una proteína de la membrana del espermatozoide (p95) activa una respuesta del mismo, mediada por proteínas-G y enzimas tirosina-quinasa, que desencadenan el proceso de la RA.

Hay un número considerable de sustancias presentes en el oviducto, en el momento de la ovulación, que pueden facilitar la RA de los espermatozoides. Así, el líquido folicular y el cúmulo celular parecen estimular al espermatozoide (Yanagimachi, 1969; Gwatkin *et al.*, 1972).

La RA, en la mayoría de las ocasiones, comienza a producirse cuando el gameto masculino se aproxima al cúmulo o a la zona pelúcida. Este suceso indica la existencia probable de factores procedentes del cúmulo o del propio oocito que estimulan la RA.

Aunque el mecanismo íntimo de la capacitación y RA ha sido revisado por multitud de autores (Yanagimachi, 1988; Wassarman, 1988; Martínez *et al.*, 1989), todavía existen puntos desconocidos en estos procesos; por otro lado, no se puede asegurar que los mecanismos que favorecen o intervienen en la capacitación de los

espermatozoides *in vitro* sean los mismos que *in vivo*. En cualquier caso, aunque se han señalado en parte anteriormente, parece que los procesos intrínsecos de la capacitación y RA son, de manera esquemática, los siguientes:

- Aumento por parte del espermatozoide de la permeabilidad al calcio extracelular.
- Alteración de la estructura normal de la membrana.
- Activación del sistema de la adenil-ciclasa.
- Liberación de las enzimas acrosomales.

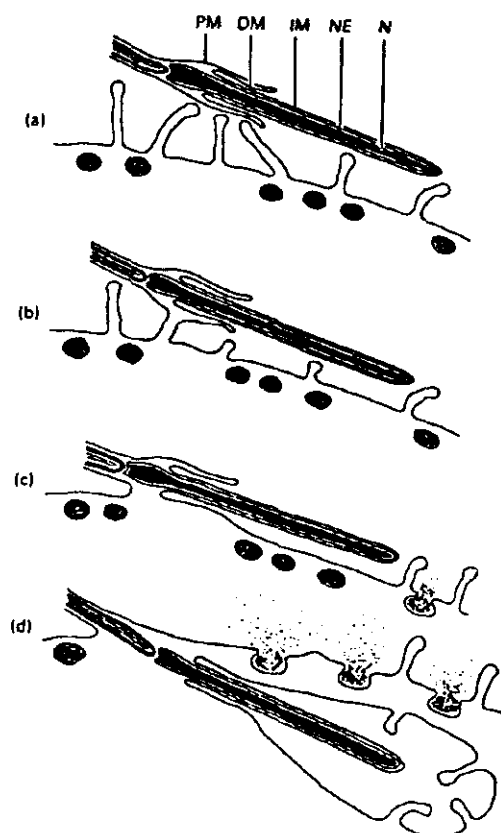
2.3.- FECUNDACION.

El espermatozoide alcanza la membrana plasmática del oocito, después de atravesar las células del cúmulo y la zona pelúcida. El paso de la membrana se realiza rápidamente, 15-20 minutos, (Hyttel, 1988) y en él intervienen, tanto la liberación de enzimas del acrosoma, como la gran motilidad que presenta el espermatozoide capacitado-reaccionado (Yanagimachi, 1988).

El contacto, entre ambos gametos, comienza cuando llega el espermatozoide a la membrana del oocito. En este momento, las microvellosidades del oocito contactan con el segmento ecuatorial del espermatozoide (Hyttel *et al.*, 1988) y comienza la penetración de éste. Cuando un espermatozoide entra, se produce, por un lado, la liberación del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino, para evitar la polispermia (Cran, 1989) y por otro, la activación de la meiosis y la extrusión del 2° corpúsculo polar (CP).

En cuanto al primer punto, el momento de partida, para la liberación del contenido de los gránulos corticales, es la estimulación, de una proteína G, provocada por el espermatozoide, situada en la membrana plasmática del oocito. Seguidamente, se ejerce una señal citoplásmica por medio de mensajeros celulares (diacil-glicerol e inositol-fosfato) que aumenta los

niveles de calcio. Este aumento del calcio provoca la estimulación de la protein-quinasa C, que actúa liberando el contenido de los GC al espacio perivitelino (enzimas proteolíticas, glucoproteínas y ovoperoxidasa; Cran, 1989). El tiempo que tarda en completarse este proceso es muy variable, desde un mínimo de 8 minutos en el hamster (Gwatkin *et al.*, 1973) y hasta 2 ó 3 horas en la vaca (Hyttel, 1988; Véase el esquema 3).



Esquema 3. Representación de la entrada de la cabeza del espermatozoide en el oocito bovino. (a) El espermatozoide ya ha sufrido la RA y presenta el núcleo (N), membrana acrosomal externa (OM), membrana acrosomal interna (IM) y la membrana plasmática (PM). Las microvellosidades del oocito contactan con el segmento ecuatorial del espermatozoide. Los gránulos corticales (GC) están situados bajo la membrana plasmática del oocito. (b) Fusión de membranas entre el segmento ecuatorial y las microvellosidades. (c) La zona de fusión se extiende por toda la parte ecuatorial y post-acrosomal. La liberación del contenido de los GC al espacio perivitelino ya se ha iniciado. (d) La cabeza espermática ya ha penetrado y se encuentra rodeada de la membrana acrosomal interna mientras que el segmento ecuatorial se queda en la membrana del oocito. (De Hyttel *et al.*, 1989).

En el mecanismo que impide la polispermia también intervienen activamente las ZP. En concreto, además de otras acciones, ciertas enzimas de los gránulos corticales inactivan, en la zona pelúcida, las funciones de las ZP₂ y ZP₃, con lo que los espermatozoides no pueden fijarse a la misma ni sufrir la RA (Bleil y Wassarman, 1983; Wassarman, 1988).

Sobre el segundo punto, en algunas especies el 2° CP es liberado inmediatamente antes de la entrada del gameto masculino. En el ganado bovino la extrusión completa del 2° CP se produce unas 4 horas después de la entrada del espermatozoide (Hyttel, 1988, Hyttel *et al.*, 1989).

En todos los mamíferos, los componentes celulares del espermatozoide (membrana acrosomal, material perinuclear, mitocondrias del tracto intermedio, etc.) se incorporan al citoplasma del oocito. La cabeza del espermatozoide comienza a descondensarse, por la acción de ciertos factores formados durante la maduración citoplásmica del oocito (Thibault, 1978), sobre todo, a los niveles intracelulares de glutatión (Yoshida *et al.*, 1992).

La cabeza espermática decondensada y los cromosomas femeninos se rodean de una membrana nuclear, procedente del retículo endoplásmico del oocito, constituyéndose los pronúcleos (PN) masculino y femenino (Yanagimachi, 1988). Estas etapas están caracterizadas por la síntesis de ADN. Los PN aumentan de tamaño sincrónicamente, en pocas horas. En la especie bovina, el PN se forma muy poco tiempo antes que el femenino, por lo que algunos autores señalan que por ello el PN masculino tiene un tamaño mayor que el femenino (McLaren, 1980).

A las pocas horas, los PN se encuentran en el centro del oocito, se disuelven las membranas pronucleares y los cromosomas adoptan la configuración de la profase mitótica (Hunter, 1974; Hyttel, 1988).

Yanagimachi (1988) indica que después de la sincariosis (unión del material genético masculino y femenino), en la metafase mitótica, se completa la fecundación

y comienza el desarrollo embrionario.

ESQUEMA 3. Cronología de la interacción oocito-espermatozoide en la fecundación bovina.*

Horas tras la fusión de los gametos.	Cambios nucleares	Cambios citoplasmáticos
0	Fusión de los gametos Telofase II del oocito.	
2-3	Comienza la formación del 2° CP.	Liberación del contenido de los Gránulos corticales Aumento del n° de Ap. de Golgi.
4-6	Localización periférica del espermatozoide. Descondensación de la cabeza del esperm. Comienzan a formarse la membrana de los PN. Extrusión del 2° CP	Aumento del n° de RER. Emigración del RER hacia los PN.
6-7	Se completa la envoltura de los PN PN esféricos y grandes	Agrupamiento de RER alrededor de los PN
8-18	Migración de los PN hacia el centro del oocito Pérdida del tracto intermedio del espermato.	
19	Ondulación de las membranas de los PN. PN casi fusionados	
20	Desaparición de las membranas nucleares y fusión de los PN. Sincariosis.	Agrupamiento del Ap. de Golgi alrededor del núcleo.
24	Profase mitótica. Citocinesis. Estadio de 2 células.	Reordenación de los microtúbulos y del Ap. de Golgi.

* Según Crozet, (1984); Hyttel, (1988); Hyttel *et al.*, (1989).

2.4.- FECUNDACION IN VITRO.

El primer ternero procedente de fecundación *in vitro* (FIV) nació en el año 1981 (Brackett *et al.*, 1982). Años antes, Chang (1959), consiguió el primer éxito de esta tecnología al obtener una camada de conejos tras la FIV y transferencia embrionaria posterior.

En estos primeros trabajos se sientan las claves del futuro éxito de las técnicas de FIV: por un lado, se señala la necesidad de que los espermatozoides se capaciten antes del contacto con el gameto femenino (Austin, 1951; Chang, 1951), y, por otro, se desarrollan técnicas sencillas de tinción que permiten evidenciar la fecundación de los oocitos (Chang, 1951).

Han tenido que pasar varios años para lograr resultados, en otras especies, como los obtenidos por Chang en el conejo: Toyoda y Chang (1974) en la rata; Steptoe y Edwards (1978) en humana y Cheng *et al.* (1986) en la oveja y la cerda. Este retraso fue debido a que los mismos procedimientos no se pueden extrapolar a otras especies animales, por las características específicas de cada una de ellas. Además, Brackett *et al.* (1982) señalan que todos los avances conseguidos, en las técnicas de FIV, son el resultado de la investigación sobre la maduración del oocito, sobre la capacitación del espermatozoide y sobre el desarrollo embrionario posterior a la FIV.

Los fenómenos de FIV, en el ganado bovino, han sido estudiados por muchos autores (Sreenan, 1970; Hunter *et al.*, 1972; Shea *et al.*, 1976; Iritani y Niwa, 1977; Newcomb *et al.*, 1978) hasta culminar, como se ha indicado, en el éxito obtenido por Brackett *et al.*, (1982).

El mayor éxito del procedimiento de FIV se demuestra al producir individuos vivos procedentes de FIV, utilizando tanto oocitos madurados *in vivo* (Brackett *et al.*, 1982; Sirard y Lambert, 1985; Sirard *et al.*, 1985) o madurados *in vitro* (Critser *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1988), aunque la eficacia de los procesos de FIV disminuye respecto a la fecundación natural, de igual modo que cuando se utilizan oocitos madurados *in vivo* frente a los madurados *in vitro* (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986).

En general según First y Parrish (1987), todos los sistemas de FIV requieren los siguientes puntos:

- 1.- Utilización de un sistema que asegure la maduración del oocito.
- 2.- Obtención de los espermatozoides.
- 3.- Métodos de capacitación *in vitro* del espermatozoide.
- 4.- Factores que influyen en la capacitación *in vitro* del espermatozoide.
- 5.- Establecer las condiciones de inseminación.

2.4.1.- MADURACION DE LOS OOCITOS.

Los oocitos que se utilizan para la FIV provienen de dos fuentes esenciales, madurados *in vivo* e *in vitro* (VER PUNTO 2.1).

Los oocitos madurados *in vivo* se obtienen, normalmente, de ovarios de hembras superovuladas. Los oocitos se recogen de los folículos preovulatorios, inmediatamente antes de la ovulación o del oviducto, después de ocurrida ésta (Brackett *et al.*, 1982; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). Los oocitos también se pueden recoger, por este procedimiento, de hembras sacrificadas del matadero o por medio de un laparoscópio (Sirard y Lambert, 1985; Lambert *et al.*, 1986). En cualquiera de los dos casos, los oocitos se recogen una vez que han completado su maduración.

Sin embargo, esta metodología tiene dos inconvenientes: uno de ellos es que exige un aparataje y especialización adecuada, ya que hay que averiguar el momento exacto de la ovulación, bien para adelantarnos a ella (oocitos preovulatorios) o para recoger los oocitos inmediatamente después (post-ovulatorios). First y Parrish (1987) indican que retrasos de más de dos horas, tras la ovulación de los oocitos, se traducen en una tasa de partenogénesis, excesivamente alta. El otro inconveniente es que el número de oocitos obtenidos por hembra es impredecible y siempre está

limitado a la respuesta al tratamiento de superovulación (Toyoda, 1989). De hecho, siempre que las vacas son sometidas a tratamientos de superovulación, el número de oocitos recogidos ofrece cifras entre 5 y 10, por animal (Lambert *et al.*, 1986; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986).

Se ha conseguido nacimientos viables tras el empleo de oocitos madurados *in vitro* (Critser *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1988). La metodología seguida, comúnmente, por los autores que utilizan esta fuente de oocitos ha sido explicada en el punto 2.1.

Leibfried-Rutledge *et al.* (1987) indican que la capacidad de desarrollo embrionario utilizando oocitos madurados *in vitro* es más baja que cuando se utilizan oocitos madurados *in vivo*. Sin embargo, estos y otros autores también señalan la gran ventaja que supone utilizar esta fuente de oocitos para la FIV, ya que permite disponer de una gran cantidad de oocitos, incluso de buena calidad genética, tras el sacrificio del animal (First y Parrish, 1987; Sirard, 1989; Toyoda, 1989; Fukui, 1990).

2.4.2.- OBTENCION DE LOS ESPERMATOZOIDES.

El origen de los espermatozoides utilizados para la fecundación *in vitro* puede ser de dos tipos: obtenidos de la cola del epidídimo o eyaculados. Estos últimos a su vez pueden utilizarse directamente en fresco (diluidos o no) o se pueden emplear inmediatamente después de su descongelación.

Brackett (1983) señala que los espermatozoides epididimales tienen una mayor capacidad para acumular calcio que los eyaculados. Por otro lado, Weeler y Seidel (1986) indican que el semen fresco tarda más en capacitarse que el semen congelado. Además, desde el punto de vista práctico, la utilización del semen congelado presenta ventajas (First y Parrish, 1987), ya que permite una evidente facilidad para disponer de un número adecuado de dosis seminales de buena calidad.

Por su parte, Yanagimachi (1988) indica que la membrana plasmática de los espermatozoides eyaculados se comporta de manera más estable que la de los que provienen del epididimo, los cuales, según First y Parrish (1988) tienen dificultades para sufrir la reacción acrosómica si no existe un tratamiento previo de 30 minutos con plasma seminal.

Todo ello hace pensar que ambos tipos de espermatozoides son válidos para producir la fecundación *in vitro*. De hecho, muchos autores han utilizado espermatozoides, de origen epididimal, para sus sistemas de FIV (Ball *et al.*, 1983; Lenz *et al.*, 1983) así como espermatozoides procedentes de eyaculado (Iritani *et al.*, 1977; Parrish *et al.*, 1985).

En la actualidad, gracias al perfeccionamiento de la metodología de la inducción a la capacitación *in vitro* de los espermatozoides y en base a una disponibilidad de semen adecuado, la mayoría de los autores utilizan semen congelado, como fuente de espermatozoides, para los sistemas de FIV (Parrish *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1988; Fukui, 1990; Schellander *et al.*, 1990; Pavlov *et al.*, 1992).

2.4.3.- METODOS DE CAPACITACION *IN VITRO* DEL ESPERMATOZOIDE.

Basándose en las técnicas empleadas en los animales de experimentación, comenzaron a utilizarse métodos de capacitación de espermatozoides bovinos, apoyándose en procedimientos cuyo fin es eliminar las proteínas decapacitantes, de la membrana plasmática del espermatozoide y estimular la salida de los ácidos grasos y del colesterol de la membrana plasmática (Go y Wolf, 1985).

Sin embargo, estas técnicas no han tenido éxito en los rumiantes, teniendo en cuenta, además, que en los animales de laboratorio se emplean espermatozoides epididimales, mientras que en rumiantes se utiliza preferentemente eyaculado fresco

o congelado. Los espermatozoides epididimales pueden capacitarse con simples soluciones salinas (Ball *et al.*, 1983; Lenz *et al.*, 1983) mientras que los espermatozoides eyaculados necesitan, además, la acción de ciertos agentes que ayuden a la capacitación (Parrish *et al.*, 1986; First y Parrish, 1988).

Para conseguir la capacitación *in vitro* de los espermatozoides bovinos se siguen diversas metodologías, entre las que destacan las siguientes:

a.- Utilización de soluciones salinas (DM-HIS) con alta concentración iónica (390 mOsm/L), con el objeto de desplazar y eliminar de la membrana del espermatozoide las sustancias decapacitantes (Brackett *et al.*, 1982).

b.- Periodos de incubación de los espermatozoides muy largos (14-18 horas, en medio KRB-m), para modificar el colesterol incluido en la membrana espermática (Iritani *et al.*, 1984).

c.- Utilización de pH alcalino, en el medio de capacitación. Esto afecta al pH intracelular y desplaza de la superficie los factores decapacitantes (Cheng *et al.*, 1986).

d.- Medio capacitador TALP, que se basa en una selección previa de los espermatozoides y en la inclusión de glicosaminoglicanos u otras sustancias, en el medio de capacitación (Parrish *et al.*, 1986; Fukui, 1990; Pavlov *et al.*, 1992).

e.- Lavado y selección de los espermatozoides por su paso a través de gradientes de percoll, además de un periodo de incubación con una alta concentración de espermatozoides (Eyestone, 1992).

2.4.4.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CAPACITACION *IN VITRO* DEL ESPERMATOZOIDE.

4.1.- Temperatura. Habitualmente, se utiliza una temperatura de 39°C, teniendo en cuenta que variaciones de tan solo 0,5°C afectan seriamente a la capacitación (First y Parrish, 1988).

4.2.- pH. Para efectuar el lavado y la preincubación de los espermatozoides, el pH se mantiene a 7,4 (Parrish *et al.*, 1986; Fukui, 1990) o a 7,6 (Younis *et al.*, 1989), mientras que, durante el periodo de capacitación y en el medio de fecundación, se utiliza un pH de 7,4 (Younis *et al.*, 1989) o de 7,8 (Fukui *et al.*, 1989; Fukui, 1990). Este ha demostrado favorecer la eliminación de ciertas glicoproteínas decapacitantes que se encuentran en la superficie del espermatozoide (Cheng *et al.*, 1986).

4.3.- Concentración espermática. Durante el periodo de preincubación, para inducir la capacitación, la concentración espermática se mantiene entre 25 y 50 millones de esperm/ml (Lu *et al.*, 1987; Fukui, 1990).

4.4.- Tiempo de capacitación. Los distintos autores indican un tiempo necesario distinto, según la metodología empleada, desde 4 horas (Parrish *et al.*, 1986) hasta las 18 horas de incubación, empleadas por Iritani *et al.* (1984).

4.5.- Medios de capacitación. Su composición se basa en soluciones salinas que tienen una formulación química definida y sencilla (Yanagimachi, 1988). De acuerdo, también, con el método de capacitación seguido se utilizan varios medios: medio KRB-m (Iritani *et al.*, 1984); medio DM-HIS (Brackett *et al.*, 1982); medio TALP (medio Tyrode modificado con sales de HEPES, albúmina, lactato sódico y piruvato sódico; Parrish *et al.*, 1986; Fukui, 1990).

En cuanto a algunos de los componentes de los medios, la mayoría de ellos llevan una suplementación de B.S.A., que favorece la capacitación, ya que elimina colesterol y ácidos grasos de la membrana plasmática, los cuales impiden la capacitación (Go y Wolf, 1985) además de mantener la motilidad espermática.

Algunos autores no incluyen sales cálcicas, en los medios de lavado y capacitación espermática (Lu *et al.*, 1987; First y Parrish, 1988), mientras que la presencia de glucosa en los medios de capacitación es controvertida. Parrish *et al.*, (1986 y 1988) señalan que concentraciones de glucosa, superiores a 5 mM en el medio, inhiben la capacitación espermática inducida por la heparina sódica. Según estos mismos autores, este hecho es similar a lo que ocurre *in vivo*, ya que las concentraciones de glucosa en el oviducto bovino son muy pequeñas (del orden de 100 a 200 μ M). Por ello, la mayoría de autores no utilizan concentraciones superiores a 5 mM de glucosa, en sus medios de capacitación, aunque Fukui (1990) señala que se puede aumentar la concentración de glucosa, siempre que se aumente también la de heparina como factor capacitante.

4.6.- Osmolaridad. La concentración iónica de los medios de capacitación varía desde valores de 380 mOsm/L en el medio DM-HIS (Brackett *et al.*, 1982) hasta 290 mOsm/L en medios TALP (Parrish *et al.*, 1986).

4.7.- Variaciones individuales de los toros. Lambert *et al.* (1986) consideran un factor importante la posible variación entre los espermatozoides de los distintos toros que se utilizan para la FIV. Eyestone y First (1989) señalan, sin embargo, que las verdaderas diferencias entre los distintos machos que se empleen para la FIV se ponen de manifiesto sólo a partir del estadio de 4 células, durante el desarrollo embrionario temprano. En cualquier caso, la mayoría de los autores están de acuerdo en que la valoración cuidadosa de la fecundidad de los toros es importante al comenzar estudios relativos a la FIV y desarrollo embrionario (Gordon,

1990). En el caso del semen congelado, algunos autores utilizan pajuelas de varios toros (Parrish *et al.*, 1986) o emplean semen de un único toro de fecundidad contrastada (Ohgoda *et al.*, 1988; Fukui, 1990).

4.8.- Sustancias que favorecen la capacitación *in vitro*.

4.8.a. *Glicosaminoglicanos (GAGs)*. Son polisacáridos unidos a proteínas. Los más importantes son el condroitín-sulfato, heparan-sulfato, el ácido hialurónico y la heparina. Lee y Ax (1984) señalan la existencia de altas concentraciones de GAGs en el oviducto bovino, los cuales se comportan como inductores, muy efectivos, de la capacitación y de la reacción acrosómica, tanto de los espermatozoides epididimales (Lenz *et al.*, 1983; Ball *et al.*, 1983) como de los eyaculados (Parrish *et al.*, 1986, 1988; Fukui, 1990; Rose y Bavister, 1992; Pavlov *et al.*, 1992). El glicosaminoglicano de mayor efectividad es la heparina, debido a presentar un mayor grado de sulfatación y una elevada capacidad para unirse al espermatozoide (First y Parrish, 1988). La heparina induce la capacitación del espermatozoide por varios mecanismos (First y Parrish, 1987):

- Desplaza las proteínas decapacitantes de la membrana espermática.

- Estimula la apertura de los canales para el ión calcio, comportándose como un ionóforo.

- Activa la acción del AMP-c y de la fosfolipasa A₂ (que aumenta la concentración de fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, que, en presencia de Ca²⁺ induce la reacción acrosómica). La heparina actúa en este caso inmovilizando el ión Zn, que se comporta como inhibidor de la fosfolipasa A₂.

- Favorece la conversión de proacrosina en acrosina.

La capacitación por heparina se inhibe en presencia de concentraciones superiores a 5 mM de glucosa, aunque este efecto es reversible si los espermatozoides se incuban con dosis de 200 $\mu\text{g/ml}$ de heparina o se añade AMPc (First y Parrish, 1988).

La mayoría de los autores que emplean espermatozoides, provenientes de eyaculado, utilizan heparina, ya que como indican First y Parrish (1987, 1988) y Gordon (1990): "la utilización de heparina sódica ha demostrado ser el mejor método para inducir la capacitación y reacción acrosómica *in vitro*, en los espermatozoides bovinos".

4.8.b. *Factores de motilidad espermática.* Diversos autores (revisado por Yanagimachi 1988) indican la existencia de catecolaminas (epinefrina), varios aminoácidos (taurina, hipotaurina) y penicilamina, en el oviducto del hamster, cuyos niveles aumentan en los días del estro. Además, señalan que la adición de estas sustancias a los medios de capacitación favorecen la misma. Susko-Parrish *et al.* (1990) y Gordon (1990) señalan que la utilización de estos factores de motilidad presenta resultados satisfactorios, en el proceso de la FIV bovina.

4.8.c. *Ionóforos para el calcio.* Ball *et al.* (1983) suplementan el medio de capacitación con el ionóforo A-23187, el cual tiene el efecto de abrir los canales del calcio y favorecer la capacitación de los espermatozoides bovinos.

4.8.d. *Cafeína.* Critser *et al.* (1986) indican que el uso de cafeína provoca una hipermotilidad espermática que, no obstante, no se traduce en un aumento de espermatozoides capacitados. Sin embargo, Goto *et al.* (1988) señalan lo contrario, destacando que la suplementación con 5 mM de cafeína, durante los periodos de lavado e incubación, aumenta el número de espermatozoides capacitados.

4.8.e. *Nucleótidos cíclicos.* Algunos autores añaden AMPc a sus medios de

capacitación produciendo un efecto positivo, ya que la regulación del intercambio iónico, en la membrana del espermatozoide, está mediado por un mecanismo de fosforilación. En este mecanismo, interviene activamente la concentración intracelular de AMPc (Parrish *et al.*, 1988). Otros autores sin embargo, indican que la adición exclusiva de AMPc, o sus derivados (8-Br-AMP), no aumenta las tasas de capacitación de espermatozoides bovinos (Critser *et al.*, 1986).

4.8.f. *Proteínas asociadas al estro*. Recientemente, Anderson *et al.* (1992) han demostrado que cierta glicoproteína, presente en el oviducto bovino en el momento del estro (denominada EAP), favorece la capacitación, motilidad y aglutinación de los espermatozoides *in vitro*. La adición de esta proteína al medio favorece los índices de fecundación *in vitro* (King *et al.*, 1992).

4.8.g. *Factor activador de las plaquetas (PAF)*. Parece ser que este factor incide positivamente en el conjunto de la capacitación, favoreciendo la reacción acrosómica y aumentando la motilidad de los espermatozoides bovinos (Fukuda y Roudebush, 1992).

4.9.- **Células del cúmulo**. Gwatkin *et al.*, (1972) señalan que la presencia de las células del cúmulo juega un papel fundamental en la capacitación de espermatozoides de hamster *in vitro*. En la especie bovina, el efecto de las células del cúmulo ha sido evaluado respecto al conjunto del sistema maduración/fecundación *in vitro* teniendo en cuenta el efecto del cúmulo sobre la propia maduración del oocito y sobre los fenómenos de capacitación (Critser *et al.*, 1986; Thibault *et al.*, 1987; Shioya *et al.*, 1988). Específicamente, Fukui (1990) indica que la zona pelúcida de los oocitos, con cúmulo o desnudos, es capaz de inducir la reacción acrosómica. El mismo autor señala que los índices de espermatozoides capacitados y reaccionados aumentan, significativamente, cuando los oocitos están completamente rodeados de las células del cúmulo, respecto a los oocitos desnudos.

2.4.5.- CONDICIONES DE INSEMINACION.

Después de obtener oocitos maduros y espermatozoides capacitados deben fijarse las condiciones ambientales a las que se someten los gametos para que la fecundación tenga éxito. Del mantenimiento de estas condiciones, dentro de los márgenes fisiológicos, depende el éxito de la FIV (First y Parrish, 1987).

5.1.-Tiempo de inseminación. El tiempo que permanecen en contacto los gametos varía en función de la metodología empleada, por los distintos autores. Utilizando un medio DM-HIS para capacitar los gametos, el tiempo de inseminación es de 6 a 8 horas (Shioya *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1990) mientras que utilizando el método descrito por Parrish *et al.* (1986) o sus modificaciones (Lu *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1987) se precisan alrededor de 16 horas (Younis *et al.*, 1989; Schellander *et al.*, 1990) o de 18 a 20 horas (Sirard *et al.*, 1988; Fukui y Ono, 1989; Fukui, 1990; Rose y Bavister, 1992).

5.2.- Concentración espermática. El número de espermatozoides por oocito es un factor importante, ya que si es bajo no se produce la fecundación y si es demasiado alto se producen fenómenos de polispermia (First y Parrish, 1987). Habitualmente, se emplean dosis de entre $0,5$ a $1,5 \times 10^6$ espermatozoides/ml de medio de fecundación (Xu *et al.*, 1987; Younis *et al.*, 1989; Fukui, 1990; Rose y Bavister, 1992). La dosis espermática se ajusta en base a los espermatozoides vivos, tras los tratamientos de capacitación (First y Parrish, 1988). Lo ideal es introducir en el medio de fecundación el menor número de espermatozoides por oocito que, habitualmente, es de 10.000/oocito (First y Parrish, 1988).

Normalmente, el medio de fecundación se dispone en forma de microgotas (de 50 o 100 μ l) bajo aceite de parafina o silicona y en ellas se introducen de 5 a 10 oocitos y la concentración deseada de espermatozoides (Lenz *et al.*, 1983; Ball *et al.*, 1983; Parrish *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1987;

Younis *et al.*, 1989; Fukui, 1990; Rose y Bavister, 1992; Pavlov *et al.*, 1992).

5.3.- Condiciones fisicoquímicas. Lenz *et al.* (1983) indican que mantener una temperatura constante es fundamental para el éxito de la fecundación. En el ganado bovino, aquella se sitúa en los 39°C, ya que se favorece la capacitación y también tiene un efecto positivo sobre la producción de ácido hialurónico. Variaciones de 0,5°C afectan a la fecundación (First y Parrish, 1988). El pH del medio de fecundación se ajusta a 7,4 (Younis *et al.*, 1989) o a 7,8 (Fukui y Ono, 1989) y la concentración gaseosa a las mismas condiciones que en los sistemas de maduración *in vitro* (VER PUNTO 1.2.3c); esto es, con un 5% de CO₂ y 100% de humedad en el aire. Algunos autores añaden, además, un 5% de O₂ (Younis *et al.*, 1989). La osmolaridad del medio se sitúa en 290-300 mOsm/L (Parrish *et al.*, 1986).

5.4.- Medios de fecundación. Es el encargado de favorecer los cambios en el espermatozoide que permitan la fecundación, además de soportar energéticamente todo este proceso. Básicamente, se emplean los mismos medios utilizados en la maduración *in vitro* de los oocitos o en la preparación y capacitación de los espermatozoides (DM; M-199; KRB-m; TALP, etc).

Los medios tratan de parecerse a las condiciones naturales que los gametos encuentran en el oviducto y, así, hay varios factores a tener en cuenta: en primer lugar la relación iónica, sobre todo de los iones Na⁺/K⁺ y Ca²⁺/Mg²⁺ (Bavister, 1981). El ión calcio es imprescindible para que se produzcan los fenómenos de capacitación y de atracción del espermatozoide a la zona pelúcida (Yanagimachi, 1982).

Como fuentes energéticas, estos medios utilizan el ácido láctico y el ácido pirúvico (en forma de lactato sódico y piruvato sódico, respectivamente). Aquellos sistemas que emplean heparina sódica, para inducir la capacitación, no llevan suplementación con glucosa, ya que inhibe

la acción de la heparina. Otros autores señalan, sin embargo, que concentraciones de 12 mM de glucosa pueden añadirse al medio de fecundación siempre y cuando se utilizan concentraciones de heparina sódica 20 veces mayores a las normales (Fukui, 1990).

La albúmina bovina (BSA) es el mejor sustrato protéico para la fecundación, ya que favorece la reacción acrosómica y la penetración del espermatozoide (Parrish *et al.*, 1988).

5.5.- Sustancias que se añaden al medio de fecundación. En los medios de fecundación pueden añadirse las mismas sustancias que favorecen la capacitación *in vitro*, de los espermatozoides bovinos (VER PUNTO 4). Así, se producen efectos positivos al añadir factores de motilidad espermática (epinefrina, hipotaurina y penicilamina), glicosaminoglicanos, cafeína, etc. Niwa y Ohgoda (1988) indican un efecto sinérgico de esta última y la heparina cuando se añaden juntas, al medio de fecundación.

Susko-Parrish *et al.* (1990) señalan un efecto positivo del bisulfito de sodio cuando se añade al medio de fecundación. Por otro lado, la adición de células epiteliales oviductales bovinas al medio aumentan también las tasas de fecundación (Miller *et al.*, 1992).

2.4.6.- CRITERIOS DE FECUNDACION.

Para considerar un oocito fecundado se deben visualizar los pronúcleos, masculino y femenino, con el resto de la cola espermática y con los dos corpúsculos polares; esto no siempre es así, ya que, a veces, alguno de los corpúsculos polares se desprende, por efecto de la técnica de tinción, o la cola del espermatozoide no se visualiza (Shioya *et al.*, 1988; Fukui y Ono, 1989; Fukui, 1990; Schellander *et al.*, 1990).

Algunos autores, también, señalan como criterio válido la visualización de cabezas espermáticas o del pronúcleo masculino, en distintos grados de decondensación, siempre acompañado del pronúcleo femenino (Ohgoda *et al.*, 1988).

Hensleigh y Hunter (1985) utilizan como criterio de fecundación la existencia de segmentaciones que produzcan blastómeros, en los estadios de 2 y 4 células.

Anormalidades en la FIV. Xu y Greve (1988) y Hyttel (1988) señalan que los principales problemas que se pueden encontrar en el desarrollo de la fecundación *in vitro* son los siguientes: poliespermia (por la entrada de más de un espermatozoide, al interior del oocito), poliginia (aparición de más de un pronúcleo femenino), asincronía en el desarrollo de ambos pronúcleos y activación de la citoquinesis antes de tiempo.

Según los diversos autores, las causas de que se produzcan estas alteraciones son de diferente naturaleza, y, entre ellas, se destacan las siguientes:

- Incorrecciones en el tiempo de inseminación, la concentración espermática, el volumen y número de oocitos/gota, etc. (Xu y Greve, 1988).

- Fallos en la extrusión del primer o segundo corpúsculo polar (Xu y Greve, 1988).

- Influencia de los diversos componentes de los medios de maduración y fecundación, sobre todo, del tipo de suero (Fukui y Ono, 1989).

- Ineficacia de la reacción de zona tras el paso del primer espermatozoide, debido a una incorrecta disposición de los gránulos corticales durante la maduración citoplásmica del oocito (Cran, 1989).

- Existencia o no de células del cúmulo, en el momento del contacto con los espermatozoides (Fukui, 1990).

2.4.7.- APLICACIONES DE LAS TECNICAS DE FECUNDACION *IN VITRO*.

Los estudios sobre fecundación *in vitro* fueron desarrollados originariamente, con objeto de dilucidar los mecanismos y procesos que intervinieran en la fecundación.

Desde hace algunos años, el empleo de las técnicas de FIV ha supuesto alcanzar nuevos objetivos. Entre estas nuevas aplicaciones se pueden destacar las siguientes: producción de embriones a partir de ovarios obtenidos en el matadero (Goto *et al.*, 1988; Lu *et al.*, 1988; Sirard *et al.*, 1988); soluciones a ciertos tipos de infertilidad (Iritani y Niwa, 1977; Brackett *et al.*, 1982; Sirard *et al.*, 1985); inyección intranuclear de genes en un determinado estadio del desarrollo embrionario (Sreenan, 1988); test para probar la capacidad fecundante de los toros (Graham y Foote, 1984; First y Parrish, 1987) y como medio para investigar los procesos fisiológicos envueltos en las etapas del desarrollo embrionario temprano (Xu y Greve, 1988; Sirard *et al.*, 1989; Coskum *et al.*, 1991).

3.- FACTORES DE CRECIMIENTO

3.1.- INTRODUCCION.

Las gonadotropinas, como señales hormonales emitidas por el sistema endocrino, regulan el fisiologismo de los folículos ováricos. Además, existen otros mensajeros hormonales implicados también en estos procesos que no dependen del sistema endocrino, sino del sistema paracrino (actuando a corta distancia del lugar donde se producen, p. ej. entre folículos ováricos) y del sistema autocrino (ejerciendo su efecto en las mismas células que los producen). De cualquier manera, estos tres sistemas de producción hormonal actúan sinérgicamente, en el control de las funciones ováricas.

La mayoría de los autores asignan a las gonadotropinas un papel fundamental en el inicio y mantenimiento de la funcionalidad del folículo ovárico, comenzando por el desarrollo de los folículos y continuando con la selección, dominancia y maduración de los mismos, antes de la ovulación (Jones, 1980). Sin embargo, Tonetta y DiZerega (1989) indican que las gonadotropinas y los esteroides foliculares son necesarios, pero insuficientes por sí mismos, para completar el ciclo ovárico. Por ello, sugieren que es imprescindible la presencia de otros factores paracrinós y/o autocrinós intraováricos, para el desarrollo correcto de estos procesos (DiZerega *et al.*, 1983; Cahill y Findlay, 1984; Hammond *et al.*, 1985).

Entre todos esos factores intraováricos destacan, por su importancia, los llamados factores de crecimiento (FC), compuestos proteicos de bajo peso molecular (<30.000) que actúan localmente, en el ovario, como hormonas paracrinós/autocrinós. Su acción se efectúa mediante receptores localizados en las membranas celulares y por un sistema de mensajeros celulares. Este sistema es muy variado, incluyendo cambios en los niveles intracelulares del ión calcio, AMPc, fosfoinositol, etc. Por otro lado, sus acciones metabólicas incluyen cambios en el transporte de aminoácidos, de la glucosa y en la síntesis de ARN y proteínas.

Se han descubierto, hasta la fecha, más de veinte factores implicados en mecanismos fisiológicos tan diferentes como la regulación de la multiplicación y desarrollo de varios tipos celulares, de las funciones inmunitarias y de la proliferación y maduración de células sanguíneas de las series eritrocítica y linfocítica.

Entre los factores de crecimiento que poseen acciones específicas sobre la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y teca y que por lo tanto, actúan en el folículo ovárico se pueden citar los siguientes: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF), factor de transformación del crecimiento (TGF) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF).

Estos FC se han aislado de líquido folicular porcino y vacuno (Hsu y Hammond, 1987; Hammond *et al.*, 1988; Echternkamp *et al.*, 1990), de células teca e intersticiales ováricas (Hernández *et al.*, 1988), de líquido folicular humano (Westergaard y Andersen, 1989) etc. Además, se ha demostrado que existen receptores para estos factores en células de la granulosa bovina (Franchimont *et al.*, 1986), porcina (Hsu *et al.*, 1987) y humana (Tapanainen *et al.*, 1987).

Por otro lado, desde hace, relativamente, pocos años se ha comprobado que ciertos FC favorecen la maduración *in vitro* de oocitos de rata y ratón (Aberdan y Deckel, 1985; Deckel y Serizly, 1985; Downs, 1989; Pellicer *et al.*, 1989), hecho contrastado también en otros animales domésticos (Sanbuissho *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1991 y 1992; Illera *et al.*, 1992; Sommer *et al.*, 1992; Coskum *et al.*, 1992).

Los argumentos anteriormente citados parecen demostrar que los FC y, en especial, el EGF e IGF-1, juegan un papel importante en la regulación de los mecanismos ováricos de diferenciación y proliferación celular en el periodo pre-ovulatorio y que, además, intervienen en los procesos de reiniciación meiótica del oocito (Hill, 1989; Armstrong *et al.*, 1991).

3.2.- FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF).

3.2.a.- Estructura. Es una proteína compuesta por una cadena de 53 aminoácidos, con un peso molecular de 6.041, descrita por primera vez por Cohen (1962). Taylor *et al.* (1970) aislaron el EGF en la glándula submaxilar del ratón, donde se encuentra unido a una proteína con un p.m. total de 29.000. El EGF presenta una estructura globular compacta debido a tres puentes disulfuro que unen su cadena polipeptídica (véase la Figura 2). Además, se caracteriza porque su cadena peptídica no incluye cisteína, alanina ni fenil-alanina.



Figura 2. Estructura del EGF.

3.2.b.- Receptor. El receptor del EGF, en la célula, es una glucoproteína con un p.m. de 170.000, que presenta una zona de unión intracelular y otra zona extracelular. Los receptores de membrana del EGF tienen una actividad tirosina-quinasa específica y, por lo tanto, son capaces de fosforilar residuos de tirosina, bien en el mismo receptor o en presencia de un determinado sustrato de naturaleza todavía desconocida (Hunter, 1984). Downward *et al.* (1984) indican que todas las actividades enzimáticas de autofosforilación suceden en la zona citoplásmica del receptor, que se diferencia de otros receptores por poseer dos regiones de cisteína en la zona extracelular. Por otro lado, la unión del EGF con su receptor puede ser degradada por enzimas lisosómicas intracelulares (Carpenter y Cohen, 1979).

En las células de la granulosa se han localizado receptores para el EGF (Vlodavsky *et al.*, 1978; Jones *et al.*, 1982; St. Arnaud *et al.*, 1983) cuyo número aumenta, en el momento del estro, debido al aumento de las concentraciones de

gonadotropinas y esteroides ováricos (Mondschein y Shomberg, 1981; St. Arnaud *et al.*, 1983; Feng *et al.*, 1987).

En el testículo, también se han encontrado receptores EGF en las células de Leydig y de Sertoli (Tsusutmi *et al.*, 1986) mostrando una participación en la regulación de la espermatogénesis (Tsusutmi *et al.*, 1986; Amador *et al.*, 1992).

3.2.c.- Mecanismo de acción. Rozengurt (1986) señala que la unión del EGF al receptor produce una señal que, inmediatamente, es reconocida por el núcleo de la célula. En este mecanismo de reconocimiento pueden intervenir fosfoproteínas, inositolfosfato, diacil-glicerol, nucleótidos cíclicos o, incluso, iones mono o divalentes. El EGF aumenta el nivel de calcio iónico intracelular (Molenaar *et al.*, 1983) y estimula la fosforilación proteica de ciertas subunidades del ribosoma (Pelech *et al.*, 1987).

3.2.d.- Acciones ováricas y sobre la maduración del oocito. El EGF inhibe la formación del AMPc en las células de la granulosa, al impedir la actuación de la enzima adenilato-ciclasa (Downs, 1989).

Concentraciones de EGF de 0,1 a 100 ng/ml paralizan la secreción basal de inhibina, en las células de la granulosa (Franchimont *et al.*, 1986; Bicksak *et al.*, 1986) y también se inhibe la capacidad aromatizante de la esteroidogénesis inducida por la FSH (Hsueh *et al.*, 1981; Franchimont *et al.*, 1987). Por otro lado, Skinner *et al.*, (1987) demostraron que las células tecales e intersticiales, del ovario de rata, producen EGF, que participa en la regulación de las funciones de las células de la granulosa.

El EGF estimula, *in vitro*, la proliferación de las células de la granulosa, en varias especies, excepto en la rata. Ciertos niveles de FSH pueden suprimir esta acción mitogénica debido posiblemente a una saturación del receptor (Gospodaroviz y Bialecki, 1979).

El EGF actúa sobre la maduración del oocito eliminando las causas que lo mantienen en reposo meiótico, en el estadio de dictiato de la profase I (Vesícula Germinal). Las causas que mantienen la detención meiótica del oocito son varias; entre ellas se indica que la presencia de las prolongaciones intercelulares, entre las células del cúmulo y el oocito, que atraviesan la zona pelúcida de éste, provocan un paso de AMPc desde el cúmulo al interior del oocito (Hillsenjo *et al.*, 1978; Shultz *et al.*, 1983; Eppig *et al.*, 1983) y estas altas concentraciones de AMPc dentro del oocito mantienen detenida la meiosis (GV). Moor (1980) indicaron que la activación de la meiosis (hecho observable por la desaparición de la Vesícula Germinal) se inicia con una desconexión entre el oocito y las células del cúmulo que le rodean. Este suceso se ha observado en ratona (Eppig, 1982), rata (Deckel y Serizly, 1985), oveja (Moor y Gandolfi, 1987), cerda (Motlik, 1989) y vaca (Hyttel *et al.*, 1987).

El principal estimulador de la síntesis de AMPc es la FSH y, por lo tanto, la acción del EGF, para favorecer la maduración del oocito, podría efectuarse interrumpiendo la acción de esta hormona sobre las células del cúmulo (Pellicer *et al.*, 1989). Por otro lado, el aumento de los niveles de gonadotropinas en el ciclo estral incrementa las concentraciones de EGF presentes en el líquido folicular, causando un bloqueo de los receptores para la FSH, en las células del cúmulo. Este hecho, según Downs *et al.* (1988), puede originar una modificación en la actuación de la enzima adenilato ciclasa y, en consecuencia, una bajada de los niveles intracelulares de AMPc en el oocito, ocasionando la activación de la meiosis y la maduración del mismo. Downs (1989) señala que la acción específica del EGF sobre el oocito aún no está bien definida, aunque se ha demostrado que la unión del EGF con su receptor activa la protein-quinasa C (PKC), (James y Bradshaw, 1984; Aberdam y Dekel, 1985) que fosforiliza una proteína desconocida. Este hecho activa una serie de señales que son las desencadenantes de la maduración del oocito.

Además de la PKC, en la transmisión de las señales intracelulares tras la unión del EGF con su receptor, están implicados otros grupos enzimáticos como son la caseína quinasa II (CK-II) y la protein-quinasa p34. La primera se estimula con insulina o EGF (Sommercorn *et al.*, 1987) mientras que la segunda, al activarse,

actúa defosforilando un componente del factor promotor de la maduración del oocito (MPF) (Newport y Kirschner, 1984).

El EGF favorece la maduración *in vitro* de oocitos de rata y ratona, incluso cuando son cultivados con potentes inhibidores de la maduración, como la hipoxantina o el AMPc y sus análogos (el dbc-AMP y 8-Br-AMPc) (Feng *et al.*, 1988; Downs *et al.*, 1988; Vorobeve y Nikitin, 1991). El EGF también estimula la maduración *in vitro* de oocitos, de otras especies (Sanbuissho *et al.*, 1990; Das *et al.*, 1992; Rath *et al.*, 1992; Illera *et al.*, 1992; Coskum *et al.*, 1992)

Downs (1989) señala que el EGF es el factor de crecimiento más efectivo para inducir la maduración *in vitro* y provocar la expansión del cúmulo celular. Este efecto, según Voroebe y Nikitin (1991), es análogo al producido al administrar LH o hCG.

Los estudios sobre la acción ejercida por el EGF sobre los oocitos, demuestran claramente que la acción de este factor de crecimiento no se ejerce directamente, sino que se efectúa siempre a través del cúmulo celular (Downs, 1988), ya que con oocitos desnudos no se observa una respuesta significativa de la maduración *in vitro* cuando se exponen al EGF (Dekel y Serizly, 1985; Sambuissho *et al.*, 1990; Coskum *et al.*, 1992; Das *et al.*, 1992).

3.3.- FACTOR DE CRECIMIENTO, SIMILAR A LA INSULINA (IGF).

3.3.a.- Estructura. Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs) son polipéptidos de una sola cadena y de un p.m. de 7.500, con semejanzas funcionales y estructurales a la insulina (Tonetta y DiZerega, 1989). Se han aislado dos tipos de IGFs: el IGF-1 (con 70 aminoácidos) y el IGF-2 (con 67 aminoácidos). Hay una similitud de un 45% en los aminoácidos que componen el IGF-1, el IGF-2 y la insulina y algunos autores han sugerido que tanto los IGFs como la insulina proceden originariamente de un mismo gen.

El IGF-1, también denominado Somatomedina C, es un polipéptido básico, con un p.m. de 7.649 (Rochestein, 1982), presenta una estructura espacial semejante a la insulina (una cadena peptídica entrecruzada con tres puentes disulfuro), aunque presenta regiones con residuos aminoacídicos diferentes (Fig. 2). La similitud con la insulina hace que se produzcan reacciones cruzadas entre ambos (Blundell y Humble, 1980) y también entre IGF-1 e IGF-2. El IGF-1 circulante en sangre se encuentra unido a una proteína transportadora.

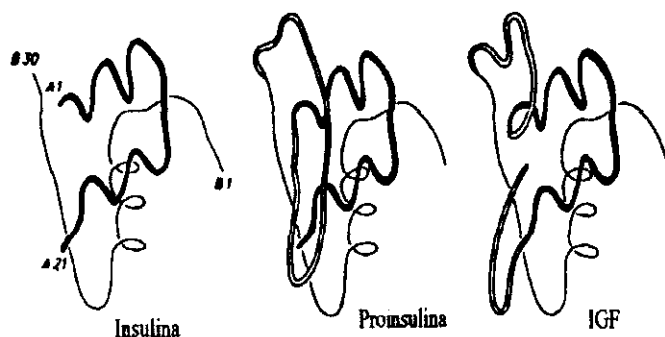


Figura 3.- Estructura globular de la insulina, proinsulina e IGF.

Hammond *et al.* (1985) detectaron que las células de la granulosa porcina cultivadas *in vitro* secretaban IGF-1. Hígado, riñón y páncreas también sintetizan IGF-1 y además, Hammond *et al.* (1986) y Echerkamp *et al.* (1990) han detectado la presencia del IGF-1 en el líquido folicular porcino y vacuno, respectivamente.

3.3.b.- Receptores. Este factor de crecimiento puede unirse al menos a dos tipos distintos de receptores (King y Khan, 1985), incluyendo al propio receptor de la insulina. Massagué y Czech (1982) han propuesto un tipo de receptor para el IGF-1 que tiene una estructura similar al de la insulina (dos componentes α y β , de pesos moleculares 130.000 y 90.000, respectivamente, unidos por dos puentes disulfuro) con un p.m. total mayor de 300.000, similar a la configuración de las inmunoglobulinas.

Al igual que con el EGF, la unión del IGF-1 con su receptor provoca acciones de fosforilización (Sasaki *et al.*, 1985). Czech (1982) comprobó que la afinidad del receptor tenía el siguiente orden: IGF-1 > IGF-2 > insulina.

Se han encontrado receptores para el IGF-1 en gran cantidad de tejidos y tipos celulares: fibroblastos humanos, músculo de ratón, hígado y páncreas, etc., entre otros (D'Ercole y Underwood, 1981; Rosenfield y Dollar, 1982).

Balboni *et al.* (1987) y Adashi *et al.* (1988) demostraron la existencia de receptores para el IGF-1 en las células de la granulosa y teca del folículo primario ovárico y en la membrana citoplásmica del oocito. Letcher *et al.* (1989) también han descrito la presencia de receptores IGF-1 en embriones porcinos de estadios anteriores a la implantación.

3.3.c.- Mecanismo de acción. Tras su unión con el receptor en la membrana celular, el IGF-1 genera reacciones bioquímicas de autofosforilación o de fosforilación de proteínas en el citoplasma, gracias a la actuación de una tirosina-quinasa asociada al receptor. Estos efectos se producen sobre los residuos de tirosina e inducen la formación de un segundo mensajero, de naturaleza desconocida, que dará lugar al efecto celular correspondiente.

En general, por este mecanismo, el IGF-1 interviene en la regulación de procesos necesarios para la síntesis de ADN en la célula (Yang y Pardee, 1986). Zumstein y Stiles, (1987) sugieren que la intervención del IGF-1 en los procesos de transcripción del ADN, se debe a la síntesis de proteínas citoplásmicas específicas que son todavía desconocidas. Además, también participa aumentando el metabolismo de oxidación, a nivel mitocondrial, e incrementando la síntesis de androgénos y estradiol, en las células de la granulosa (Hernández *et al.*, 1988).

3.3.d.- Acciones ováricas y sobre la maduración del oocito. Las células de la granulosa tienen la característica de secretar y responder, a la vez, al IGF-1 (Baranao y Hammond, 1984a; Hammond *et al.*, 1985). Zhang *et al.* (1987) demostraron que el IGF-1 producía efectos similares a los inducidos por la FSH, en las células de la granulosa cultivadas *in vitro*, aunque señalaban que no eran efectos aditivos ni producidos por los mismos mecanismos celulares. Otros autores señalan que el IGF-1 se comporta en el ovario como un "amplificador natural" de las

acciones ejercidas por la FSH (Hsu y Hammond, 1987). Hammond *et al.* (1988) indican que la producción y acción del IGF-1 está estimulada por la presencia de hormonas gonadotropas y ováricas. Por otro lado, la concentración de IGF-1, en el líquido folicular, aumenta con el tamaño del folículo (Driancourt, 1991).

Aunque el IGF-1 tiene un papel importante en los mecanismos de diferenciación de las células granulosas, su función, en la proliferación celular, no está clara, ya que se ha demostrado un cierto efecto mitogénico para las células de la granulosa en el cerdo y en la vaca, pero, al parecer, no en otras especies animales (Baranao y Hammond, 1984; Adashi *et al.*, 1985).

Los efectos del IGF-1 están mediados por receptores específicos existentes en las células de la granulosa (Baranao y Hammond, 1984; Adashi *et al.*, 1988). Entre otras acciones, el IGF-1 estimula la actividad de la adenilato ciclasa y la inducción de la creación de receptores para LH, en la célula granulosa (Adashi *et al.*, 1988); por otro lado, la acción favorecedora del IGF-1 sobre estas células se pone de manifiesto al ser capaz de estimular la producción de estradiol, a partir de andrógenos de origen tecal (Hernández *et al.*, 1988).

Por tanto, el IGF-1, secretado por las células de la granulosa, potencia los efectos de la FSH en la aromatización y estimulación de la síntesis de andrógenos tecales. Además, la secreción de IGF-1 ovárica se estimula con niveles crecientes de gonadotropinas (FSH y LH), pudiéndose así ampliar las acciones de estas hormonas a nivel local (Hsu y Hammond, 1987).

Las acciones del IGF-1, sobre la maduración de oocitos de rana *in vitro* (*Xenopus laevis*), demuestran que el estímulo que inicia la maduración del oocito va asociado a una reducción del transporte de glucosa y de aminoácidos (Hainaut *et al.*, 1991a). Estos mismos autores señalan que la maduración del oocito comienza tras el contacto del IGF-1 con un receptor, con actividad tirosina-quinasa, situado en la membrana del oocito. Esta activación provoca la defosforilación de la proteína p34, un componente del MPF (Hainaut *et al.*, 1991b).

El IGF-1 y el IGF-2 tienen un efecto positivo sobre la maduración *in vitro* de oocitos de rata (Feng *et al.*, 1988), a concentraciones de 50 ng/ml. Estos mismos autores indican que, por el contrario, la insulina no produce acción alguna en este sentido. Downs (1989) también describe una leve acción positiva del IGF-1 sobre oocitos de ratón utilizando concentraciones entre 0,1 y 100 ng/ml.

Otros autores señalan que la adición de IGF-1 junto a gonadotropinas en el medio de maduración de oocitos bovinos, favorece la maduración *in vitro* y el posterior desarrollo embrionario (Herlerr *et al.*, 1992; Harper y Brackett, 1992).

3.4.- FACTOR DE TRANSFORMACION DEL CRECIMIENTO (TGF).

Se han descrito dos tipos de TGF, α y β , distintos en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. El tipo α es una cadena simple de 50 aminoácidos. El tipo β es un compuesto proteico con dos cadenas idénticas de 112 aminoácidos y un p.m. de 25.000 (Adashi y Resnik, 1986).

Existe una gran semejanza estructural y funcional del TGF- α con el EGF; tanto es así, que incluso se une a los mismos receptores del EGF (Massagué, 1983; Brucker *et al.*, 1991). El TGF- α se produce en las células teca-ováricas y regula procesos ováricos con acciones mitogénicas similares al EGF.

Por el contrario, el TGF- β se comporta como un inhibidor muy potente de la proliferación celular *in vitro* (Mercola y Stiles, 1988). Se ha aislado en el folículo piloso, en mioblastos e incluso en células del sistema inmunitario, como los monocitos y los linfocitos T (Laiho *et al.*, 1986). En las células que derivan del mesodermo embrionario puede actuar de dos formas: aumentando o inhibiendo las acciones de otros FC en la replicación celular. Además, Adashi y Resnik (1986) demostraron que ambos TGFs α/β tienen efectos antagónicos en ciertas funciones ováricas, como la capacidad aromatizante de las células de la granulosa.

El mecanismo de actuación del TGF- β se ejecuta por una vía, no bien conocida todavía, distinta a la de la activación de una protein-quinasa que es la común en el resto de los factores de crecimiento, descritos anteriormente.

Ambos tipos de TGF han demostrado su capacidad para inducir la maduración de oocitos *in vitro*. El TGF- α emplea el mismo mecanismo que el EGF en la maduración de oocitos de ratón *in vitro*, ya que puede actuar mediante su unión al receptor del EGF. Al igual que el EGF, la acción sobre la maduración del TGF- α se ejerce sólo sobre oocitos con células del cúmulo y no sobre oocitos desnudos (Brucker *et al.*, 1991).

Feng *et al.* (1988) indican un efecto claramente positivo del TGF- β sobre la maduración *in vitro* de oocitos de rata, ejerciendo su acción a través del cúmulo. Estos mismos autores señalan que la adición de TGF- β y EGF estimula la maduración de los oocitos siempre que el TGF- β se encuentre en pequeñas cantidades, ya que, de lo contrario, a concentraciones mayores a 100 nM, suprime el efecto del EGF.

Sin embargo, Downs (1989) señala que el TGF- β no tiene una acción favorecedora sobre la maduración *in vitro*.

3.5.- FACTOR DE CRECIMIENTO PLAQUETARIO (PDGF).

Estructuralmente es una glucoproteína básica, con dos variedades biológicas equipotentes de 31.000 y 28.000 de p.m. respectivamente, que se identificaron por primera vez en los gránulos α de las plaquetas sanguíneas (Devel y Huang, 1984). Ambos tipos se componen de dos cadenas glucoproteicas, α y β , unidas por puentes disulfuro.

El receptor es una glucoproteína con actividad protein-kinasa. El PDGF incrementa la glucólisis celular y estimula la síntesis de ciertas prostaglandinas y

reorganiza los filamentos de actina en la mitosis, activa la proliferación celular de los tipos celulares que derivan embriológicamente del mesodermo, como los fibroblastos, células gliales y células de la granulosa (Devel y Huang, 1984). Rappolee *et al.* (1988) y Mercola y Stiles (1988) han detectado la presencia de receptores de membrana para el PDGF en los oocitos de ratón y de rana.

Este FC no presenta un efecto positivo sobre la maduración *in vitro* de oocitos en el ratón cuando se utiliza a una concentración de 100 ng/ml (Downs, 1989).

3.6.- FACTOR FIBROBLASTICO DE CRECIMIENTO (FGF).

Es una proteína con un p.m. de 16.000, aislada por primera vez de la hipófisis bovina (Gospodaroviz, 1975). Se comporta como un mitógeno muy potente para las células de tejidos derivados del mesénquima o del neuroectodermo embrionarios, como son los condrocitos, fibroblastos, mioblastos, células gliales, células de la corteza adrenal y células de la granulosa (Gospodaroviz *et al.*, 1978).

Kimelmann y Kirchner (1987) indican que el ARN-m que codifica parte del FGF ya se encuentra en estadios embrionarios tempranos. En el adulto, el FGF está distribuido en muchos órganos como las glándulas adrenales, el ovario, el hígado y la hipófisis.

Tonetta y DiZerega (1989) señalan que el FGF está implicado en los mecanismos de proliferación de las células de la granulosa y en la vascularización de la teca, durante el desarrollo folicular.

Downs (1989) señala que concentraciones de 10 ng/ml de FGF favorecen ligeramente la maduración *in vitro* de los oocitos de ratón.

3.7.- FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF).

Fué aislado por primera vez de la glándula submaxilar del ratón y del veneno de ciertas serpientes, presentan un p.m. de 26.500 y de 13.000, respectivamente (Calissano *et al.*, 1984). Presenta receptores de alta y baja afinidad en la membrana celular y también en la membrana nuclear (Yankner y Shooter, 1979).

El sistema de incorporación al interior de la célula, del complejo NGF-receptor, se basa en la formación de una vesícula en el citoplasma, que engloba al complejo, tras su paso a través de la membrana celular. Posteriormente, se degrada, por la acción de enzimas lisosómicas, dejando libre el NGF para unirse a un receptor intracelular desconocido. De esta manera, se ejerce la acción directamente sobre el núcleo, aunque por mecanismos aún no aclarados (Norman y Litwack, 1984).

El NGF actúa preferentemente a nivel nervioso, mediante cambios en la permeabilidad de la membrana celular, en la síntesis de ARN-m y proteínas, en la proliferación y extensión de los procesos neuríticos etc. (Horii y Varon, 1977).

Sobre la maduración *in vitro* de los oocitos, no ha producido, hasta el momento, efectos positivos en la rafa (Dekel y Serizly, 1985), ni en el ratón (Downs, 1989).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS.

1. MADURACION *IN VITRO*.

1.1.- MATERIAL.

1.1.1.- EQUIPO.

El equipo empleado en la maduración *in vitro* es el siguiente:

Autoclave	Cabina de flujo laminar
Balanza de precisión	Frigorífico-congelador
pH-metro y osmómetro	Estéreomicroscopio
Baño termostático	Incubadora de CO ₂
Placa calorífica	Microscopio
Material de laboratorio	

Todos los materiales empleados se esterilizan mediante autoclave (Autester-G, Selecta), a 120°C y 1 atmósfera de presión, durante 30 minutos.

Los ingredientes que componen los medios de cultivo se pesan en una balanza de precisión (Mettler H 72). Para preparar los medios y para el lavado del material se emplea agua bidestilada y desionizada (WaterPro, Labconco).

El ajuste del pH de los medios se realiza con un pH-metro (Crison 505). La osmolaridad de los distintos medios de cultivo se determina mediante osmómetro (Advanced Wide-Ranged, 3W2).

Los sueros sanguíneos utilizados en los medios de cultivo (Suero Fetal Bovino, SFB y Suero de Vaca en Estro, SVE) son inactivados por calor al baño maría (Memmertz), a 56°C, durante media hora. Este procedimiento tiene por objeto

desactivar ciertas proteínas del complemento que tienen efectos negativos en los sistemas de cultivo *in vitro*.

Las manipulaciones que exigen condiciones de esterilidad, como la preparación y filtrado de los medios, alícuotas de sueros y de factores de crecimiento, entre otras, se efectúan en cabina de flujo laminar (Captair, Gruma) provista de luz ultravioleta.

El almacenamiento y conservación de los medios de cultivo, factores de crecimiento, sueros etc., se realiza en una cámara frigorífica a 0-4°C, y en un congelador que mantiene la temperatura a -24°C.

La localización, selección y fijación de los oocitos, así como su paso a través de las distintas placas de lavado, se llevan a cabo empleando un estéreomicroscopio (Wild M3C), con oculares de 10 aumentos (10x de magnificación para localizar y lavar los oocitos y 25x para su selección).

Durante el tiempo necesario para la localización, lavado y selección de los oocitos, éstos se mantienen sobre una placa calorífica (Mini Tüb) a 39°C, con el fin de evitar los cambios bruscos de temperatura.

El cultivo *in vitro* de los oocitos se realiza en la incubadora de CO₂ (Heraeus) que proporciona, de manera constante, un ambiente de 39°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad en el aire.

Para determinar las configuraciones cromosómicas de los oocitos, tras su fijación y tinción, se utiliza un microscopio con contraste de fases (Leitz Laborlux) a 120, 200 y 400 aumentos.

La conservación de los medios de cultivo y sueros se realiza en botes y tubos de cristal (Pyrex), esterilizados previamente en autoclave, en las condiciones anteriormente mencionadas.

El transporte de los ovarios desde el matadero hasta el laboratorio se efectúa en un termo (Valira) de 2,5 l de capacidad, para mantener la temperatura adecuada y para su disección y limpieza se emplean tijeras Pean rectas, previamente esterilizadas en el autoclave.

El material de laboratorio utilizado: probetas, matraces de 40, 50 y 100 ml, pipetas de cristal de 1, 2, 5 y 10 ml etc., es el suministrado por las firmas comerciales más comunes.

Los medios de cultivo se esterilizan mediante filtros de membrana estériles (Millex-GS, Millipore), con diámetros de poro de $0,8\mu$, $0,4\mu$ y de $0,2\mu$ conectados a jeringas plásticas también estériles (Becton-Dickinson). El filtro utilizado para el aceite de silicona (Serva) que cubre las microgotas de medio de cultivo, tiene un diámetro de poro de $0,4\mu$.

La punción y aspiración de los folículos ováricos se lleva a cabo utilizando jeringas estériles plásticas, desechables, de 10 ml (Becton-Dickinson), conectadas a agujas (Becton-Dickinson) de 18 Gauge (1,2 x 40 mm). La sedimentación de los oocitos se realiza en tubos cónicos de centrifuga estériles de 15 ml (Nunc). La aspiración del sedimento se efectúa mediante una pipeta Pasteur de 5 ml (Brand) conectada a una goma de aspiración. Para recoger el líquido folicular, después de aspirado, así como para el lavado y el cultivo de los oocitos, se utilizan placas Petri estériles de poliestireno, de 35 y 90 mm de diámetro (Nunc). Los oocitos se manipulan siempre utilizando micropipetas desechables de $20\mu\text{l}$, previamente esterilizadas (Brand). Además, con dichas micropipetas, se fabrican capilares de un diámetro ligeramente mayor al de los oocitos con la ayuda de un mechero de alcohol, a fin de denudarlos de las células del cúmulo antes de su fijación.

Para la fijación y tinción de los oocitos se utilizan portaobjetos de cristal de 26 x 76 mm y cubreobjetos de 18 x 18 mm (Menzel-Glaser).

1.1.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y COMPOSICION.

En la maduración *in vitro* de oocitos se emplean los medios siguientes:

1- Medio de transporte.

El medio utilizado para el transporte de los ovarios, desde el matadero hasta el laboratorio (Tabla 1), es una solución fosfato-salina tamponada (PBS, Serva), suplementada con un 2 % de SFB y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina, CEPA), a una temperatura de 35-38°C.

TABLA 1. Composición del medio de transporte.

NaCl	8,000
KCl	0,200
Na ₂ HPO ₄	1,150
KH ₂ PO ₄	0,200
CaCl ₂ (Anhidr)	0,100
MgCl ₂ + 6H ₂ O	0,100
SFB	2 %
Penicilina	100 UI/ml
Estreptomicina	10 mg/ml

2- Medio de lavado (M-199 L).

Para el lavado de los oocitos se emplea, como medio base, el M-199 con sales de Earle (Sigma), (Tabla 2); se le añade l-Glutamina (20 mM, Gibco), antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 10 mg/ml de estreptomicina), 2% de SFB y sales de Hepes (25 mM, Sigma).

3- Medio de maduración (M-199).

Tiene la misma composición que el anterior, aunque se diferencia por estar tamponado con bicarbonato sódico y suplementado con un 10% de suero (SFB o SVE) y con factores de crecimiento, según los distintos tratamientos experimentales.

Los tres medios se ajustan a pH 7,4 y a una osmolaridad de 295 ± 5 mOs/L.

Tanto los sueros, como los factores de crecimiento, se incorporan a los medios el mismo día del cultivo *in vitro*. Los medios se equilibran, antes de su utilización, durante dos horas como mínimo en la incubadora de CO₂.

TABLA 2. COMPOSICION del M-199* (g/L).

<u>Sales minerales</u>			
Cloruro de calcio	0,265	Calciferol	0,0001
Nitrato férrico	0,0007	Clorhidrato de colina	0,0005
Sulfato magnésico	0,0976	Acido fólico	0,00001
Cloruro de potasio	0,400	Menadiona	0,0001
Acetato sódico (anhidr)	0,050	Mio-Inositol	0,00005
Cloruro sódico	6,800	Niacinamida	0,000025
Fosfato Na (monobásico)	0,122	Acido nicotínico	0,000025
<u>Aminoácidos</u>			
DL-Alanina	0,050	Ac. para-aminobenzoico	0,00005
L-Arginina	0,070	D-Acido pantoténico	0,00001
DL-Acido aspártico	0,060	Piridoxal	0,000025
L-Cisteína	0,00011	Piridoxina	0,000025
L-Cistina	0,026	Acetato de retinol	0,00014
DL-Acido Glutámico	0,1336	Riboflavina	0,00001
Glicina	0,050	Fosfato de tocoferol	0,00001
L-Histidina	0,02188	Tiamina	0,00001
Hidroxi-L-Prolina	0,010	<u>Otros</u>	
DL-Isoleucina	0,040	Sulfato de adenina	0,010
DL-Leucina	0,120	Trifosfato de adenina	0,001
L-Lisina	0,070	Acido adenilico	0,0002385
DL-Metionina	0,030	Colesterol	0,0002
DL-Fenilalanina	0,050	Desoxirribosa	0,0005
L-Prolina	0,040	Glucosa	1,000
DL-Serina	0,050	Glutation (reducido)	0,00005
DL-Treonina	0,060	Guanina	0,0003
DL-Triptófano	0,020	Hipoxantina	0,0003
L-Tirosina	0,05766	Tween 80	0,020
DL-Valina	0,050	Ribosa	0,0005
<u>Vitaminas</u>			
Acido ascórbico	0,0000566	Timina	0,0003
D-Biotina	0,00001	Uracilo	0,0003
		Xantina	0,000344

*Morgan *et al.*, 1950.

1.1.3.- PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

En la preparación de todos los medios se utiliza agua bidestilada y desionizada. El pH se ajusta a 7,4, la osmolaridad a 295 ± 5 mOs/L y se esteriliza mediante el paso a través de un filtro de membrana, con un diámetro de poro de $0,22 \mu$, en campana de flujo laminar.

Posteriormente, se almacenan en frascos de cristal estériles de 10 ml, a 4°C hasta el momento de su utilización.

Los dos tipos de sueros que se emplean son el SVE y el SFB. El primero se obtuvo de vacas, 7 horas después del inicio de los signos psicossomáticos del estro (Kruip, 1988). La sangre, tras su extracción, se dejó reposar en tubos estériles durante 48 horas a 4°C , manteniendo un ángulo de 45° , con el fin de obtener el suero. El SFB lo suministran firmas comerciales ya preparado (Cultek). Ambos tipos de suero se inactivan al baño maría a 56°C , durante 30 minutos.

Seguidamente, se esterilizan de la misma manera que los medios y se alicuotan y almacenan a -24°C en tubos de cristal, estériles, hasta el día de su uso.

Los factores del crecimiento utilizados, EGF (0,1 mg, Sigma Chemical Co.) e IGF-I ($10 \mu\text{g}$, Boehringer Mannheim), se solubilizan con 5 ml de M-199, sin suero, se diluyen y alicuotan en tubos plásticos estériles (Eppendorf).

Para el EGF, cada tubo contiene 50 ng en un volumen final de $10 \mu\text{l}$ y para el IGF-1, 100 ng en $25 \mu\text{l}$. Las alícuotas se congelan posteriormente a -24°C hasta el momento de su uso. El producto congelado tiene una validez máxima de tres meses.

1.2.- METODOS.

1.2.1.- OBTENCION DE LOS OVARIOS.

Los ovarios se obtuvieron de novillas sacrificadas en el matadero (GYPISA, Pozuelo de Alarcón, Madrid) y fueron recogidos rápidamente tras la exanguinación de los animales. Se transportaron al laboratorio en un termo con PBS a 35-38°C y siempre dentro de las dos horas siguientes a la obtención de los mismos.

Una vez en el laboratorio se lavan tres veces con PBS, para eliminar sangre y adherencias. Para mantener la temperatura de los ovarios, durante su procesado, se colocan en un vaso de precipitado (con 500 ml de PBS) en el baño termostático a 38°C.

1.2.2. OBTENCION DE LOS OOCITOS.

Se aspira el contenido de los folículos cuyo diámetro esté comprendido entre 2 y 8 mm, utilizando agujas hipodérmicas de 18 G, conectadas a jeringuillas plásticas de 10 ml. El líquido folicular se deposita en tubos cónicos de centrifuga, dejándolos en reposo durante 30 minutos en la incubadora de CO₂ (a 39°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad en el aire), con el fin de favorecer la precipitación del sedimento que está compuesto de oocitos, células foliculares, células de descamación etc.

Transcurrido este tiempo, el sedimento se aspira con una pipeta Pasteur y es depositado en una placa Petri de 9 cm de diámetro, junto con una proporción igual de medio de lavado (M-199L).

Los oocitos se localizan y recogen utilizando una lupa estereoscópica a 25x, mediante micropipeta de 20 µl conectada a una goma de aspiración. Los oocitos aislados de esta manera, del líquido folicular, se introducen en la primera placa de

lavado (L1) y, seguidamente, se cambian de una placa de lavado a otra (L1-L2-L3-L4 y L5); cada una de las placas de lavado tiene 2 ml de medio. Este procedimiento tiene por objeto eliminar las impurezas que llevan adheridas los oocitos antes de seleccionarlos y colocarlos en el medio de maduración.

El paso de los oocitos por las distintas placas de lavado se debe realizar rápidamente, ya que los gametos femeninos son extremadamente sensibles a los cambios de temperatura y pH.

1.2.2.a.- Selección de los oocitos.

La selección de los oocitos se establece en función de los siguientes criterios:

Todos los oocitos considerados aptos para la maduración *in vitro* deben poseer un citoplasma con un granulado fino y uniforme. El ooplasma debe llenar completamente el espacio delimitado por la zona pelúcida.

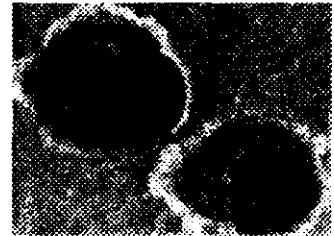
Aquellos oocitos que presentan un acusado espacio perivitelino, el citoplasma retraído, abundante vacuolización o la zona pelúcida rota, no son considerados aptos para el estudio y se eliminan.

Las células del **cúmulo** que rodean el oocito deben presentarse en capas celulares uniformes y compactas, no deben estar ni expandidas ni dispersas. Tampoco pueden presentar aglutinaciones celulares y deben permitir la distinción del oocito y la zona pelúcida.

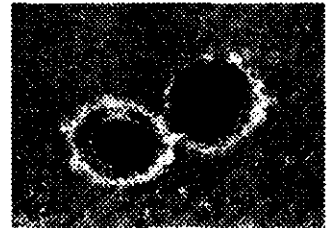
1.2.2.b.- Clasificación de los oocitos.

Una vez seleccionados, y antes de iniciar el período de cultivo, los oocitos se clasifican en tres categorías, según la morfología del cúmulo de células que lo rodean:

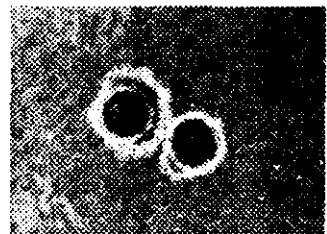
Oocitos tipo A. Presentan un cúmulo con más de 6 capas de células.



Oocitos tipo B. Están rodeados tan sólo por 4-6 capas celulares.



Oocitos tipo C. Se encuentran desnudos o parcialmente desnudos de células del cúmulo.



La maduración de cada tipo de oocitos siempre se realiza de manera independiente de los otros tipos.

1.2.3.- CONDICIONES DEL CULTIVO DE MADURACION.

Los oocitos se cultivan en placas Petri estériles, de 9 cm de diámetro. El medio de maduración se dispone en las placas en forma de microgotas (50 μ l); estas

1.2.3.- CONDICIONES DEL CULTIVO DE MADURACION.

Los oocitos se cultivan en placas Petri estériles, de 9 cm de diámetro. El medio de maduración se dispone en las placas en forma de microgotas (50 μ l); estas se forman utilizando una jeringa estéril de 2 ml, conectada a una aguja hipodérmica, también estéril, de 23 G.

Posteriormente, las microgotas se cubren totalmente con aceite de silicona y se colocan, durante un mínimo de dos horas, en la incubadora de CO₂ antes de iniciar el periodo de maduración *in vitro*. Este procedimiento tiene como fin equilibrar el medio de cultivo con las condiciones ambientales en la incubadora. En cada microgota se colocan 5 oocitos del mismo tipo morfológico.

La maduración *in vitro* se lleva a cabo en la incubadora de CO₂, con una temperatura de 39°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad en el aire, durante un periodo de 24 horas.

1.2.4.- EXPERIENCIAS DE MADURACION *IN VITRO*.

Experimento 1. Efecto de los sueros y de los factores de crecimiento sobre la expansión de las células del cúmulo en la maduración *in vitro* de los oocitos.

Para evaluar el efecto de los factores de crecimiento y los sueros sobre la expansión del cúmulo celular durante la maduración de los oocitos *in vitro*, hay que tener en cuenta la expansión del cúmulo celular que rodea los oocitos. En este experimento solamente se utilizan oocitos del tipo A (con un cúmulo celular de más de 6 capas de células).

La maduración nuclear de los oocitos se determina tras su fijación y tinción. En ambos casos, expansión y maduración, la experiencia se lleva a cabo a las 24 h

de iniciar el cultivo de maduración *in vitro*.

Los oocitos se cultivaron para la maduración *in vitro* en los siguientes medios, constituyendo en total 12 tratamientos:

GRUPO I. M-199 sin suplementación con suero.

Tratamiento 1: M-199.

Tratamiento 2: M-199 + EGF (50 ng/ml).

Tratamiento 3: M-199 + IGF-1 (100 ng/ml).

Tratamiento 4: M-199 + EGF (50 ng/ml) + IGF-1 (100 ng/ml).

GRUPO II. M-199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino.

Tratamiento 5: M-199 + 10% S.F.B..

Tratamiento 6: M-199 + 10% S.F.B. + EGF (50 ng/ml).

Tratamiento 7: M-199 + 10% S.F.B. + IGF-1 (100 ng/ml).

Tratamiento 8: M-199 + 10% S.F.B. + EGF (50 ng/ml) + IGF-1 (100 ng/ml).

GRUPO III. M-199 suplementado con 10% de Suero de Vaca en Estro.

Tratamiento 9: M-199 + 10% S.V.E..

Tratamiento 10: M-199 + 10% S.V.E. + EGF (50 ng/ml).

Tratamiento 11: M-199 + 10% S.V.E. + IGF-1 (100 ng/ml).

Tratamiento 12: M-199 + 10% S.V.E. + EGF (50 ng/ml) + IGF-1 (100 ng/ml).

En este experimento se utilizaron un total de 1.096 oocitos.

Experimento 2. Efecto de los tipos de suero y de los factores de crecimiento en la maduración *in vitro*.

Para determinar la influencia de dos sueros distintos, sobre la maduración *in vitro*, el medio de cultivo se suplementó con Suero Fetal Bovino (SFB) o con Suero de Vaca en Estro (SVE). De esta manera, se definen tres grupos de medios de cultivo: Grupo I, sin suero y tomado como grupo control; Grupo II, con SFB y

Grupo III con SVE.

La concentración de ambos sueros en el medio de maduración es del 10% v/v y siempre se añaden el mismo día del cultivo *in vitro*, cuando se prepara el medio de maduración.

A los medios anteriores se añadieron factores de crecimiento para estudiar la acción de éstos sobre la maduración *in vitro* de los oocitos. Estos FC, (EGF e IGF-1) se añadieron a los tres grupos de medios de maduración, definidos en el punto anterior. De esta manera, en cada grupo de medios de cultivo quedan definidos 5 tratamientos de maduración distintos, como se observa en la siguiente tabla:

GRUPO I. M-199 sin suplementación con suero.

Tratamiento 1: M-199.

Tratamiento 2: M-199 + EGF (20 ng/ml).

Tratamiento 3: M-199 + EGF (50 ng/ml).

Tratamiento 4: M-199 + IGF-1 (100 ng/ml).

Tratamiento 5: M-199 + EGF (50 ng/ml) + IGF-1 (100 ng/ml).

GRUPO II. M-199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino.

Tratamiento 6: M-199 + 10% S.F.B..

Tratamiento 7: M-199 + 10% S.F.B. + EGF (20 ng/ml).

Tratamiento 8: M-199 + 10% S.F.B. + EGF (50 ng/ml).

Tratamiento 9: M-199 + 10% S.F.B. + IGF-1 (100 ng/ml).

Tratamiento 10: M-199 + 10% S.F.B. + EGF (50 ng/ml) + IGF-1 (100 ng/ml).

GRUPO III. M-199 suplementado con 10% de Suero de Vaca en Estro.

Tratamiento 11: M-199 + 10% S.V.E..

Tratamiento 12: M-199 + 10% S.V.E. + EGF (20 ng/ml).

Tratamiento 13: M-199 + 10% S.V.E. + EGF (50 ng/ml).

Tratamiento 14: M-199 + 10% S.V.E. + IGF-1 (100 ng/ml).

Tratamiento 15: M-199 + 10% S.V.E. + EGF (50 ng/ml) + IGF-1 (100 ng/ml).

En este experimento se utilizaron los tres tipos morfológicos de oocitos (tipos A, B y C) según la clasificación descrita anteriormente (punto 1.2.2.b).

De este modo, se evaluaron un total de 4.974 oocitos, 1.515 oocitos en el grupo control (sin suero), 1.678 oocitos con SFB y 1.781 con SVE.

Experimento 3. Efecto de las células del cumulo en la maduración *in vitro* del oocito.

Para determinar la influencia de las células del cúmulo en la maduración *in vitro*, se cultivaron los oocitos en los medios de maduración, según el número de capas del cúmulo que presentan (tipos A, B y C, punto 1.2.2.b). El cultivo se realizó de manera independiente en los tres grupos, utilizando para ello el sistema de microgotas.

Con el fin de estudiar además las acciones de los sueros y los FC, se emplearon, en la maduración de cada grupo, los 15 medios descritos en el experimento anterior.

Se evaluaron un total de 1.794 oocitos del tipo A, 1.573 del tipo B y 1.607 del tipo C.

2. FECUNDACION *IN VITRO*.

2.1.- MATERIAL.

2.1.1.- EQUIPO.

El equipo empleado para la fecundación *in vitro* es el mismo que se utiliza para la maduración *in vitro*, salvo el siguiente:

Para conservar y manejar las pajuelas de semen congelado se dispuso de un tanque de nitrógeno líquido (Taylor-Warton 2C2).

Las centrifugaciones para el lavado del semen se efectuaron en una centrífuga (Heraeus) con temperatura controlada.

Para realizar diluciones y añadir volúmenes a las gotas de fecundación se utilizaron pipetas automáticas (Eppendorf). Las puntas de dichas pipetas se esterilizaron en autoclave en las condiciones indicadas en el punto 1.1.1.

El recuento del número de espermatozoides se efectuó en un hematocitómetro de Bürker (Brand).

2.1.2.- MEDIOS DE CULTIVO Y COMPOSICION.

Para la fecundación *in vitro* de oocitos, se emplearon tres medios (Tabla 3) que son modificaciones del medio Tyrode (TALP, descrito por Bavister y Yanagimachi, 1977).

1. Medio de lavado y capacitación de espermatozoides (Sperm-Tl).

Este medio se ajusta a pH 7,6 (ajustado con 7,5% v/v de bicarbonato sódico, Younis *et al.*, 1989) y una osmolaridad de 295 ± 5 mOs/L. Para la capacitación de los espermatozoides se empleó el mismo medio, pero suplementado con 100 μ g/ml de heparina sódica (Sigma).

2. Medio de lavado de oocitos (L-Tl).

Después del periodo de maduración, los oocitos se lavaron tres veces con este medio que tiene un pH de 7,4 y 265 ± 5 mOs/L.

3. Medio de fecundación (Fec-Tl).

El medio donde se produce la fecundación tiene un pH de 7,4 y 295 ± 5 mOs/L de osmolaridad.

TABLA 3.- FORMULACION BASICA DE LOS MEDIOS UTILIZADOS EN LA FECUNDACION IN VITRO.

Lavado y Ingrediente	Lavado Unidades	Capacitación	oocitos	Fecundación
NaCl [*]	mM	114,0	114,0	114,0
KCl [*]	mM	3,2	3,2	3,2
NaHCO ₃ [*]	mM	25,0	2,0	25,0
Na ₂ HP0 ₄ .2HO ₂ [*]	mM	0,4	0,4	0,4
Lactato Sódico ^{**}	mM	10,0	10,0	10,0
CaCl ₂ [*]	mM	2,0	2,0	2,0
MgCl ₂ .6H ₂ O [*]	mM	0,5	0,5	0,5
Rojo fenol ^{***}	μ g/ml		10,0	
HEPES ^{***}	mM	5,0	10,0	10,0
Piruvato Sódico [*]	mM	1,0	0,5	0,5
Gentamicina ^{***}	g/ml	0,02	0,02	-
BSA (Albumina sérica Bovina Fracc. V) ^{***}	mg/ml	6,0	3,0	6,0 ^b

^{*} Sal sódica al 60%.

^b Preparada de la fracción V, libre de ácidos grasos.

^{*} (Merck).

^{***} (Sigma).

Soluciones stocks.

Piruvato sódico (25 mM)	50 mg/ml en sol. salina ^a .
Gentamicina	50 mg/ml en sol. salina
Heparina sódica ^b	5 mg/ml en sol. salina

^a (Solución salina: 0,9 g NaCl/ml en agua destilada p/v).

^b (Solamente en el medio de capacitación).

Inmediatamente antes de la utilización de los medios se añadieron, cuatro de sus componentes (sales de HEPES, piruvato sódico, albúmina sérica bovina y gentamicina). Excepto en el caso del Sperm-T1, los medios se equilibraron durante dos horas, en la incubadora de CO₂ a 39°C.

2.1.3.- PREPARACION DE LOS MEDIOS

La preparación, esterilización y conservación de los medios se efectuó de la manera indicada en el punto 1.1.3. Las condiciones de pH y de osmolaridad son distintas dependiendo del medio empleado y anteriormente se han descrito para cada medio.

2.2.- METODOS

2.2.1.- OBTENCION DEL SEMEN.

Como fuente de espermatozoides para la FIV se utilizó semen congelado procedente de toros de raza Frisona, preparado y conservado en pajuelas (CENSYRA; Colmenar Viejo, Madrid).

El semen se obtuvo mediante recogida en vagina artificial, se contrastó (motilidad > 80%, <15% morfoanomalías, <20% de acrosomas dañados) y se diluyó a dosis de 32 x 10⁶ espermatozoides/pajuela, que se congelaron posteriormente; para ello se utilizó un diluyente comercial (Triladyl).

Como comprobación, se descongelaron (39°C durante 20 segundos) y contrastaron algunas pajuelas de las destinadas a utilizar para la FIV, utilizando el Hamilton Motility Analyzer-2000 (Censyra, Colmenar Viejo, Madrid) que proporcionó los siguientes datos:

CONCENTRACION ESPERM.	3,2x10 ⁷ /ml
MOTILIDAD PROGRESIVA	42,2%
MOTILIDAD TOTAL	67,5%
VELOCIDAD RAPIDA	10,0%
VELOCIDAD MEDIA	29,0%
VELOCIDAD LENTA	5,0%
VELOCIDAD PROG. MEDIA	46,1 micras/seg
MEDIA DE MOV. RECTILINEO	91,2%
ELONGACION MEDIA	0,57 micras
FREC. MOV. FLAGELAR	9,9 Hz

El transporte de las pajuelas hasta el laboratorio y su almacenamiento y conservación hasta el día de su uso, se realizó en un tanque de nitrógeno líquido.

2.2.2.- PREPARACION DE LOS ESPERMATOZOIDES PARA LA FIV.

En el transcurso de preparación de los espermatozoides se deben evitar, en todo lo posible, los cambios bruscos de temperatura que son muy perjudiciales para los espermatozoides ya desde el momento de su descongelación. Por lo tanto, todo el material que vaya a estar en contacto con los espermatozoides debe encontrarse siempre a temperatura adecuada para evitar pérdidas de espermatozoides.

En la preparación de los espermatozoides para la FIV, a partir de semen congelado, se siguió la metodología descrita por Parrish *et al.* (1986), con algunas modificaciones. El proceso empleado consta de los siguientes pasos:

1. Descongelado del semen. Las pajuelas de semen se descongelan (39°C durante 20 segundos al baño maría), se cortan sus extremos y el semen se introduce en un tubo estéril de cristal que se mantiene en el baño termostático a 39°C. Se

toma una muestra y se comprueba la motilidad de los espermatozoides, en el microscopio, que no debe ser menor del 60-70%.

II. Separación de la fracción móvil ("Swim up"). Se deposita 1 ml de sperm-TI en seis tubos estériles de cristal (12 x 75 mm) previamente mantenidos a 39°C. Se introducen 0,25 ml de semen bajo el sperm-TI en cada tubo, utilizando para ello una pipeta estéril. Seguidamente, los tubos se llevan cuidadosamente a la incubadora de CO₂ donde se mantienen con una inclinación de 45°, durante 1 hora a 39°C, 5% de CO₂ y 100% de humedad en el aire.

Este proceso tiene por objeto separar y seleccionar los espermatozoides móviles de los que no lo son o están muertos y que, por lo tanto, no tienen poder fecundante ("Swim-up", Lopata *et al.*, 1976).

III. Lavado del semen. Tras el periodo de separación de la fracción móvil, se recogen de cada tubo 0,85 ml del sobrenadante. El total obtenido de todos los tubos se introduce en uno de centrifuga, junto con una cantidad de sperm-TI, a 39°C, hasta completar un volumen de 10 ml.

Seguidamente, se centrifuga a 1000 x g durante 9 minutos; luego se aspira, cuidadosamente, el sobrenadante y se vuelve a resuspender el sedimento con sperm-TI hasta 10 ml de volumen. Se vuelve a centrifugar, como en el paso anterior, y se repite la aspiración del sobrenadante.

De esta manera, se efectúa el "lavado" del semen, eliminándose ciertos componentes adversos (diluyente, plasma seminal, etc.) que dificultan e impiden la capacitación del espermatozoide.

Tras el aspirado del sobrenadante, se resuspende el sedimento resultante con Sperm-TI (suplementado con 100 µg/ml de heparina sódica) hasta un volumen de 0,5 ml. A continuación, se toma una muestra de 5 µl para efectuar el recuento de los espermatozoides y el resto se lleva, cuidadosamente, a la incubadora de CO₂.

IV. Inducción a la capacitación. Llegados a este punto, los espermatozoides se mantienen 15 minutos en la incubadora de CO₂, con el fin de facilitar la capacitación y la reacción acrosómica, favorecidas por la heparina. Durante este tiempo se efectúan los cálculos para averiguar la concentración de espermatozoides. El recuento de los espermatozoides se efectúa mediante una cámara de recuento tipo Bürker, utilizando el siguiente procedimiento:

Se diluyen 5 μ l del volumen de espermatozoides con 95 μ l de agua destilada a 24°C. Se coloca un cubreobjetos, sobre la cámara, y se depositan cuidadosamente, 10 μ l de esta dilución en ambas caras del hematocitómetro dejándolo en reposo 5 minutos para que sedimenten las células. Posteriormente se cuentan 25 cuadros pequeños (dimensiones 50x50x100 mm = 1/4.000 ml), en cada cara de la cámara, y se calcula la concentración de los espermatozoides de la siguiente manera:

$$\text{Esper/ml} = M \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen del cuadro} \times \% \text{ motil} \times 1000$$

M es el n° de esperm.(z)/cuadro (z/25).

Factor de dilución: 20 (5 en 95).

Volumen del cuadro (en ml): 4000.

% motil: % de espermatozoides móviles.

1000: para expresar la concentración en ml.

Después del recuento, se efectúan las diluciones correspondientes, con el fin de ajustar la concentración a 25×10^6 esperm/ml, aproximadamente.

La concentración de espermatozoides que se añade a las gotas de fecundación es de 1×10^6 esperm/ml. La fecundación se realiza en microgotas de 50 μ l, luego se necesitan 50.000 esperm/microgota. Por lo tanto, el volumen de la dilución de espermatozoides a añadir por gota es:

$$50.000/25 \times 10^6$$

Todos estos cálculos tienen como finalidad conseguir que se añada a las gotas de fecundación un volumen muy pequeño (entre 2 y 3 μ l), para no cambiar las condiciones fisicoquímicas del medio de fecundación, ya que éste está dispuesto en microgotas y, por lo tanto, tiene un volumen muy pequeño (50 μ l).

Tras el periodo de incubación, se toma una muestra de los espermatozoides con el fin de comprobar la calidad del semen. Se evalúa la motilidad (> 80%) y la aglutinación cabeza-cabeza de los espermatozoides.

2.2.3.- PREPARACION DE LOS OOCITOS.

Después de 24 horas de maduración *in vitro*, se eliminan parte de las células del cúmulo mediante el paso de los oocitos por las micropipetas. Los oocitos de cada grupo (A, B y C) se lavan, independientemente de los otros grupos, tres veces en L-T1, introduciéndose, también independientemente, en las gotas de fecundación hasta el momento de la inseminación. El medio de fecundación se dispone en microgotas de 50 μ l, situadas en placas Petri de poliestireno, estériles, de 3,5 cm de diámetro. Las microgotas se cubren totalmente con aceite de silicona y se equilibran en la estufa de CO₂ a 39°C dos horas antes de iniciar la fecundación *in vitro*. En cada microgota se colocan 5 oocitos de cada tipo.

2.2.4.- CONDICIONES DE INSEMINACION.

A cada gota de fecundación se añaden de 2 a 3 μ l del semen tratado con heparina, de manera que la concentración de espermatozoides es de 1×10^6 espermatozoides/ml. Oocitos y espermatozoides se mantienen juntos, en la incubadora durante 18-20 horas a 39°C, con un 5% de CO₂ y 100% de humedad en el aire.

2.2.5.- PRUEBAS DE FECUNDACION *IN VITRO*.

Experimento 1. Efecto del suero y de los factores de crecimiento (FC) en la fecundación *in vitro*.

Se colocaron los oocitos en tres medios distintos de maduración y se fecundaron *in vitro* bajo idénticas condiciones. Los oocitos se dividieron en los tipos anteriormente descritos (A, B y C; punto 1.2.2.b) y su maduración y fecundación se realizó de manera independiente.

Los tratamientos empleados como medios de maduración son:

Tratamiento 1: M-199 (control)

Tratamiento 2: M-199 + SFB + FC (IGF1, 100 ng/ml + EGF, 50 ng/ml)

Tratamiento 3: M-199 + SVE + FC (IGF1, 100 ng/ml + EGF, 50 ng/ml)

De esta manera se maduraron y fecundaron un total de 1.495 oocitos distribuídos de la siguiente manera: 260 oocitos con el tratamiento 1, 651 oocitos con el tratamiento 2 y 584 con el tratamiento 3.

Experimento 2. Efecto de las células del cúmulo sobre la fecundación *in vitro*.

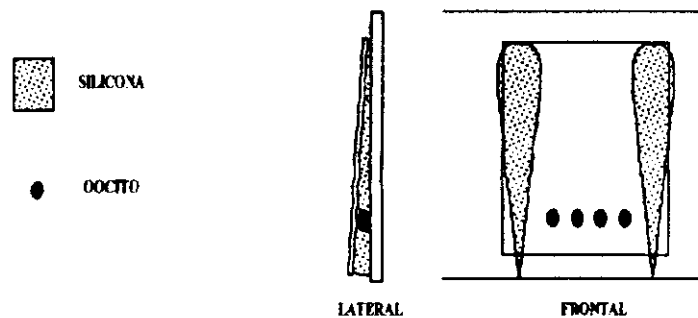
Con el fin de conocer la influencia que las capas del cúmulo tienen sobre la fecundación, los oocitos fueron distribuídos para la FIV en tres categorías (A, B y C; punto 1.2.2.b), de acuerdo con la clasificación seguida según el número de capas del cúmulo.

Se emplearon los mismos medios de maduración que en el punto anterior y, asimismo, los distintos grupos de oocitos se maduraron y fecundaron independientemente unos de otros. Se valoraron 532 oocitos del tipo A, 500 del B y 460 del tipo C.

3.- FIJACION Y TINCION.

Para visualizar las estructuras cromosómicas se utiliza una metodología de fijación y tinción basada en la técnica descrita por Chang (1951), con algunas modificaciones. El procedimiento empleado es el siguiente:

Los portaobjetos y cubreobjetos se limpian y desengrasan antes de su utilización con una mezcla de etanol (96%) y éter etílico (1:1). Sobre los portaobjetos se depositan dos líneas paralelas de silicona líquida, utilizando para ello una jeringa de 10 ml conectada a una aguja de 21 G, de tal manera que la distancia entre las dos líneas sea menor a la del ancho de los cubreobjetos (Véase figura).



Los oocitos seleccionados para la fijación y tinción se extraen del medio de cultivo y se lavan con PBS, ya que la orceína que se utiliza para la tinción puede hacer precipitar ciertos componentes del M-199. Los oocitos se aspiran repetidamente, utilizando una micropipeta de 20 μ l, con el objeto de eliminar mecánicamente las células del cúmulo.

Sobre el portaobjetos se deposita una pequeña gota de PBS en la que van incluídos 10 ó 15 oocitos, y sobre ellos se coloca el cubreobjetos, que se presiona ligeramente hasta contactar con la gota.

El siguiente paso es la introducción del portaobjetos en una cubeta de cristal con la mezcla fijadora (metanol absoluto-ácido acético glacial, 3:1, Merck), manteniéndolos así durante 48 h.

Pasado este periodo de tiempo, las preparaciones están listas para su tinción. El colorante utilizado es la orceína acética (Merk) que se prepara disolviendo 2 g del colorante en 45 ml de ácido acético glacial llevando la mezcla a ebullición. Una vez disuelto el colorante, la solución se enfría completándose el volumen con agua desionizada y bidestilada en una proporción 4,5: 5,5. La solución final se filtra (0,2 μ de diámetro de poro) antes de almacenarla. Conservando la solución a 4°C se puede utilizar durante tres meses.

Después del periodo de fijación, los portaobjetos se extraen de la solución de fijación, se secan con papel absorbente y se ponen bajo el estereomicroscopio. Se toma colorante con una jeringa de 2 ml, conectada a una aguja de 25 G, y se depositan unas gotas en uno de los extremos del portaobjetos; de esta manera, el colorante pasa poco a poco, por capilaridad, a través de todo el espacio entre portaobjetos y cubreobjetos hasta llegar al extremo opuesto.

El exceso de colorante se elimina, de las preparaciones que lo necesiten, depositando, en el mismo lugar que el colorante, ácido acético al 25% (1:3 v/v en agua desionizada) ó al 45% (4,5: 5,4 v/v en agua desionizada).

La observación de las preparaciones y la valoración de los resultados se realiza en el microscopio a 40x en campo claro y con contraste de fases.

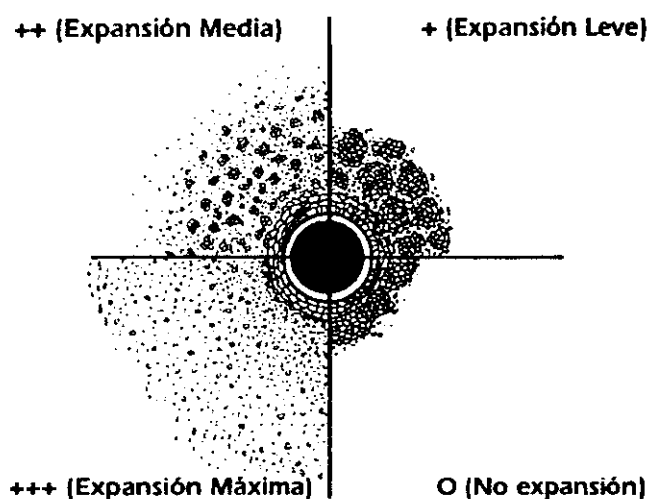
4.- EVALUACION DE LOS RESULTADOS.

4.1.- EXPANSION DEL CUMULO CELULAR.

El criterio de expansión del cúmulo (Véase el siguiente Esquema) es el siguiente:

- Expansión nula. No existe expansión apreciable del cúmulo.
- 1 Pequeña expansión de aproximadamente un diámetro del oocito.
- 2 Expansión apreciable, de unos dos diámetros del oocito.
- 3 Expansión máxima, de más de tres diámetros del oocito, e incluso de las células de la corona radiada.

Valoración de Expansión del Cúmulo



Los oocitos valorados por la expansión de su cúmulo se fijan y se tiñen con orceína acética para visualizar su estado de maduración nuclear.

4.2.- CRITERIOS DE MADURACION *IN VITRO*.

Tras la fijación y tinción de los oocitos se evalúan las siguientes configuraciones meióticas, según los criterios de Xu *et al.* (1986) y de Sirard *et al.* (1989).

Vesícula germinal (GV). El núcleo del oocito está intacto. La membrana nuclear es visible y la cromatina está solamente dispuesta alrededor del nucleolo, que habitualmente también está presente. En el resto del núcleo hay pocas zonas que se tiñan con orceína, aunque, a veces, la cromatina se distribuye en grumos que sí se tiñen.

Diacinesis (DIAC). Desaparecen la membrana nuclear y el nucleolo, lo que constituye la degradación y desaparición de la vesícula germinal (GVBD). A veces, se observa la membrana nuclear de forma difusa, y los cromosomas bivalentes comienzan a contraerse e individualizarse.

Metafase I (M-I). Los cromosomas se encuentran condensados e individualizados, al máximo, y generalmente agrupados en masa y aglutinados en la zona ecuatorial del oocito.

Anafase I (A-I). Ocurre cuando los cromosomas, que se encuentran bajo división o segregación, se disponen a lo largo del huso acromático.

Telofase I (T-I). La posición de los cromosomas es terminal, en ambos polos

del huso acromático. A veces se puede observar la membrana del primer corpúsculo polar, aunque el huso acromático esté todavía presente.

Metafase II (M-II). En este estadio los cromosomas están contraídos y situados en el ecuador del segundo huso acromático. Además, también se visualizan los cromosomas correspondientes al primer corpúsculo polar.

Degenerados (DEG). Todas aquellas estructuras nucleares que se tiñen con la orceína, que se encuentran dispersas e incompletas, o grandes zonas vacuolizadas y fragmentadas en el citoplasma del oocito, son consideradas como degenerativas.

4.3.- CRITERIOS DE FECUNDACION *IN VITRO*.

A las 18-20 horas post-inseminación, los oocitos se desnudan completamente de las capas del cúmulo, se lavan tres veces en PBS y se fijan y tiñen con objeto de determinar las configuraciones nucleares siguientes, según los criterios de Leibfried *et al.* (1986), Fukui (1990) y Coskum *et al.* (1992).

Premetafase II (PM-II). Se agrupan aquí aquellos oocitos que presentan configuraciones meióticas anteriores a la de metafase II (GV, M-I y A-T I).

Metafase II (M-II). Oocitos que presentan el estadio de M II pero ningún signo de fecundación, ni penetración espermática.

Penetrados (PEN). Se incluyen a su vez, en este grupo, los oocitos que han sido penetrados por espermatozoides, distinguiéndose entre estos los dos criterios siguientes:

Pronúcleos (PN). Aquellos oocitos que presentan dos pronúcleos (masculino y femenino), el segundo corpúsculo polar y, en ocasiones, restos de la cola del espermatozoide, o bien aquellos que presentan

un pronúcleo y una cabeza de espermatozoide en proceso de descondensación. A los oocitos que presentaron esta configuración se les denomina **fecundados (FEC)**.

Poliespérmicos (POLIS). Oocitos penetrados por más de un espermatozoide. Se pueden presentar pronúcleos masculinos, descondensación de las cabezas espermática o ambas cosas a la vez.

Degenerados (DEG). Oocitos con estructuras cromosómicas dispersas, fragmentadas o incompletas. Grandes zonas de vacuolizaciones en el citoplasma.

Otros. Partenogenéticos o estructuras no visualizables por fallos de la tinción.

5.- ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa BMDP: *Biomedical Data Program*, en el Centro de Cálculo del Campus de Somosaguas, UCM.

Se efectuaron un *Análisis de Varianza*, para estudiar la distribución de las variables estadísticas y *test de diferencia de medias* con la corrección de Bonferroni, para comprobar que los grupos de nuestro estudio y las distintas variables poseen diferencias estadísticamente significativas.

En el caso de la experiencia 3.1.B.4.1 se realizó además el estudio de la correlación general entre los grupos de oocitos expandidos y madurados. Las variables estadísticas analizadas son:

% de expansión de los oocitos en :

- Grupo control, Grupo SFB y Grupo SVE.
- FC (EGF 50, IGF-1 100 e IGF-1+EGF)
- Tipo de oocito (A)

% de maduración (GV, DEG y MII) de los oocitos en:

- Grupo control, Grupo SFB y Grupo SVE.
- FC (EGF 20, EGF 50, IGF-1 100 e IGF-1+EGF)
- Tipo de oocito (A, B y C)

% de fecundación (PEN, POLIS y FEC) en:

- Grupo control, Grupo SFB + FC (IGF-1+EGF) y Grupo SVE + FC (IGF-1+EGF).
- Tipo de oocito (A, B y C)

RESULTADOS

4.- RESULTADOS.

Los resultados obtenidos se analizan siguiendo la metodología empleada. En primer lugar, se indica el porcentaje de recuperación de oocitos respecto al número de ovarios utilizados y de folículos aspirados. Seguidamente, se exponen los experimentos correspondientes al efecto de los factores de crecimiento y sueros sobre la expansión del cúmulo celular. En tercer lugar, las cifras de maduración *in vitro* obtenidas cuando se suplementaron los medios de maduración con factores de crecimiento y sueros y, finalmente, los valores conseguidos en los experimentos correspondientes a la fecundación *in vitro* de los oocitos, mostrando la influencia del suero, los factores de crecimiento y la presencia o ausencia del cúmulo celular.

Recuperación de oocitos.

Antes de comenzar los experimentos de maduración y fecundación *in vitro*, se efectuó un trabajo previo, con el objeto de poner a punto la metodología, en lo concerniente a la punción y aspiración folicular y averiguar el número y tipo morfológico de los oocitos obtenidos empleando esta metodología. En este estudio preliminar, como demuestra la **Tabla 4**, se seleccionaron y aspiraron 1.162 folículos de 131 ovarios, lo que produjo una cifra media de 8,6 folículos por ovario (máximo de 15, mínimo 1). En total se recuperaron 778 oocitos, lo que supone un 67,5% respecto del número de folículos ováricos aspirados.

TABLA 4. Recuperación de oocitos. Estudio preliminar.

N° ovarios.	131
N° folículos aspirados	1.162
N° folíc/ovario \pm s.e.m	8,3 \pm 0,9
N° oocitos recuperados	778
% recuperac. \pm s.e.m.	67,5 \pm 3,4
N° oocitos seleccionados (%)	474 (40,7)
Tipo A (%)	188 (39,6)
Tipo B (%)	150 (32,2)
Tipo C (%)	136 (28,3)
N° oocitos ovario (A+B+C)	3,6
N° oocitos/ovario (A+B)	2,5

De todos estos oocitos recuperados, se seleccionaron, como aptos para el cultivo de maduración *in vitro* un 40,7%, divididos en los tres grupos morfológicos descritos en el material y métodos (A, B y C). Para el tipo A, se obtuvo un 39,6% del total de oocitos recuperados, para el tipo B del 32,2%, y para el C, el 28,3%.

El resto de los gametos recogidos, un 59,3%, lo componen oocitos con el cúmulo degenerado (22,7%) y oocitos con signos degenerativos en el citoplasma, rotos o inmaduros (36,6%). El número de oocitos seleccionado que poseían cúmulo celular (A+B) fue de 2,5 oocitos/ovario, mientras que para los tres tipos morfológicos (A+B+C) fue de 3,5/ovario.

Los datos sobre el número de ovarios utilizados y de folículos aspirados en los experimentos 1, 2 y 3, se presentan en las tablas 5 y 6 de manera separada, ya que, en el experimento 1 (expansión del cúmulo), sólo se utilizaron oocitos del tipo A, mientras que, en los otros dos experimentos (maduración y fecundación *in vitro*), se utilizaron los tres tipos morfológicos de oocitos.

En el conjunto de los tres experimentos se seleccionaron y aspiraron un total de 21.131 folículos de 2.562 ovarios, con una cifra media de folículos/ovario de 8,1. De todos los oocitos obtenidos se emplearon en los experimentos un total de 7.102 oocitos, de los cuales 3.422 se clasificaron del tipo A, 2.073 del B y, finalmente, 1.607 del tipo C.

TABLA 5. Recuperación de oocitos en el experimento 1.

Nº ovarios.	630
Nº folículos aspirados	4.925
Nº folic/ovario \pm s.e.m.	7,8 \pm 1,1
Nº oocitos seleccionados	1.096
Tipo A	1.096
Nº oocitos/ovario (A)	1,7

TABLA 6. Recuperación de oocitos en los experimentos 2 y 3.

N° ovarios.	1.962
N° folículos aspirados	16.206
N° folíc/ovario \pm s.e.m.	8,3 \pm 0,9
N° oocitos seleccionados	6.471
Tipo A (%)	2.326 (35,9%)
Tipo B (%)	2.073 (32,1%)
Tipo C (%)	1.607 (31,9%)
N° oocitos/ovario (A+B+C)	3,2
N° oocitos/ovario (A+B)	2,2

Experimento 1. Efecto de los sueros y los factores de crecimiento sobre la expansión de las células del cúmulo en la maduración *in vitro* de los oocitos.

Los resultados de la expansión del cúmulo celular, después de 24 horas de maduración *in vitro*, quedan reflejados en la **Tabla 7**. Al comienzo del cultivo de maduración, el cúmulo celular de todos los oocitos utilizados en el experimento, se encontraba compacto. En dicha tabla, el valor mostrado en cada grado de expansión, indica el cociente entre el número de oocitos que han logrado el nivel de expansión y el número total de oocitos cultivados en el tratamiento. Además, a cada grado de expansión descrito, se le asigna un valor numérico (0, +=1, ++=2 y +++=3), para averiguar el valor medio de la expansión de los oocitos sometidos a un determinado tratamiento. Todos los datos mostrados se refieren a 5 repeticiones del experimento por tratamiento.

En los tres grupos de tratamientos estudiados, grupo control (sin suplementación de suero), grupo de tratamientos con SFB y grupo de tratamientos con SVE, la adición de factores de crecimiento, aumentó el grado de expansión del cúmulo celular. Además, cuando en los tratamientos de los tres grupos se incluyó la adición conjunta de EGF+IGF-1, se presentó el máximo valor de expansión. .

Cuando el medio de maduración tenía EGF la expansión del cúmulo fue

mínima en el grupo control, aunque aumentó cuando se utilizó en los tratamientos con los sueros, obteniendo el valor máximo con el SVE.

El factor de crecimiento que presentó una menor incidencia en la expansión del cúmulo celular fue el IGF-1, sobre todo, en el grupo control y en el de SFB.

La **Tabla 8** muestra el resultado del test de diferencias de medias que existieron entre los distintos tratamientos. Entre ellos, el tratamiento 12 (EGF+IGF+SVE) presentó diferencias significativas con la mayoría de los tratamientos, como se pone de manifiesto en dicha tabla.

Los porcentajes de expansión del cúmulo producidos al utilizar EGF en el medio de maduración, no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

La **Tabla 9** refleja la relación entre la expansión máxima del cúmulo celular (+++) y la maduración (% de M-II) de los oocitos. Como se observa en esta tabla, en la mayoría de los tratamientos existe una conexión entre el grado de expansión máxima y el % de maduración de los oocitos. Esta relación mostró un índice estadístico de correlación general, entre todos los grupos, de 0,84 ($p < 0,05$).

La relación fue más evidente cuando se utilizó la adición conjunta de los dos factores de crecimiento con SFB y SVE (tratamientos 8 y 12). Sin embargo, como se puede observar en la **Tabla 9** y en el **Gráfico 1** los tratamientos con IGF-1 presentaron una relación entre expansión del cúmulo-maduración mucho peor que los anteriores, sobre todo en el tratamiento sin suplementación de suero donde el índice de correlación fue de 0,34 con un índice de significación $p > 0,05$.

Tabla 7.- Expansión del cúmulo celular de los oocitos en los tratamientos de maduración in vitro

SUERO	FAC. CREC. (n° oocitos)	EXPANSION 0 n (%)	EXPANSION + n (%)	EXPANSION ++ n (%)	EXPANSION +++ n (%)	MEDIA \pm S.E.M.
CONTROL n= 350	CONTROL (80)	45 (57,2)	10 (12)	6 (7,5)	19 (23,2)	0,98 \pm 0,14
	EGF (92)	21 (22,8)	17 (18,4)	11 (12,3)	43 (46,5)	1,86 \pm 0,13
	IGF-1 (87)	25 (28,7)	22 (25,3)	15 (17,2)	25 (28,7)	1,45 \pm 0,14
	EGF+IGF-1 (91)	14 (15,3)	11 (12,1)	17 (18,6)	49 (52,8)	2,11 \pm 0,13
SFB n= 368	CONTROL (83)	25 (30,1)	12 (14,4)	16 (19,2)	30 (36,1)	1,6 \pm 0,12
	EGF (101)	10 (10,1)	12 (11,8)	17 (16,8)	62 (61,3)	1,97 \pm 0,08
	IGF-1 (91)	19 (21)	10 (11,9)	22 (24,1)	40 (42,2)	1,91 \pm 0,12
	EGF+IGF-1 (93)	7 (7,5)	0 (0)	18 (19,6)	68 (73,1)	2,58 \pm 0,07
SVE n= 378	CONTROL (87)	12 (13,7)	9 (10,3)	26 (29,9)	40 (45,9)	2,08 \pm 0,38
	EGF (98)	11 (11,2)	2 (2,1)	29 (29,5)	56 (57,1)	2,32 \pm 0,09
	IGF-1 (89)	14 (15,7)	10 (11,3)	17 (19,1)	48 (54,1)	2,12 \pm 0,11
	EGF+IGF-1 (104)	0 (0)	2 (1,9)	23 (22,4)	79 (75,9)	2,87 \pm 0,04

Tabla 8.- Nivel de significación entre los tratamientos de maduración in vitro en la expansión del cúmulo celular

MEDIO	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10	T 11	T 12
T 1	*	*	**	-	***	*	***	*	*	**	***
T 2		-	-	-	-	-	*	-	-	-	*
T 3			-	-	*	-	**	-	-	-	*
T 4				-	-	-	-	-	-	-	*
T 5					*	-	***	-	*	*	***
T 6						*	-	-	-	-	-
T 7							*	-	*	-	**
T 8								-	-	-	-
T 9									-	-	*
T 10										-	-
T 11											*
T 12											

*** p<0,001; ** p<0,01 * p<0,05; - P>0,05

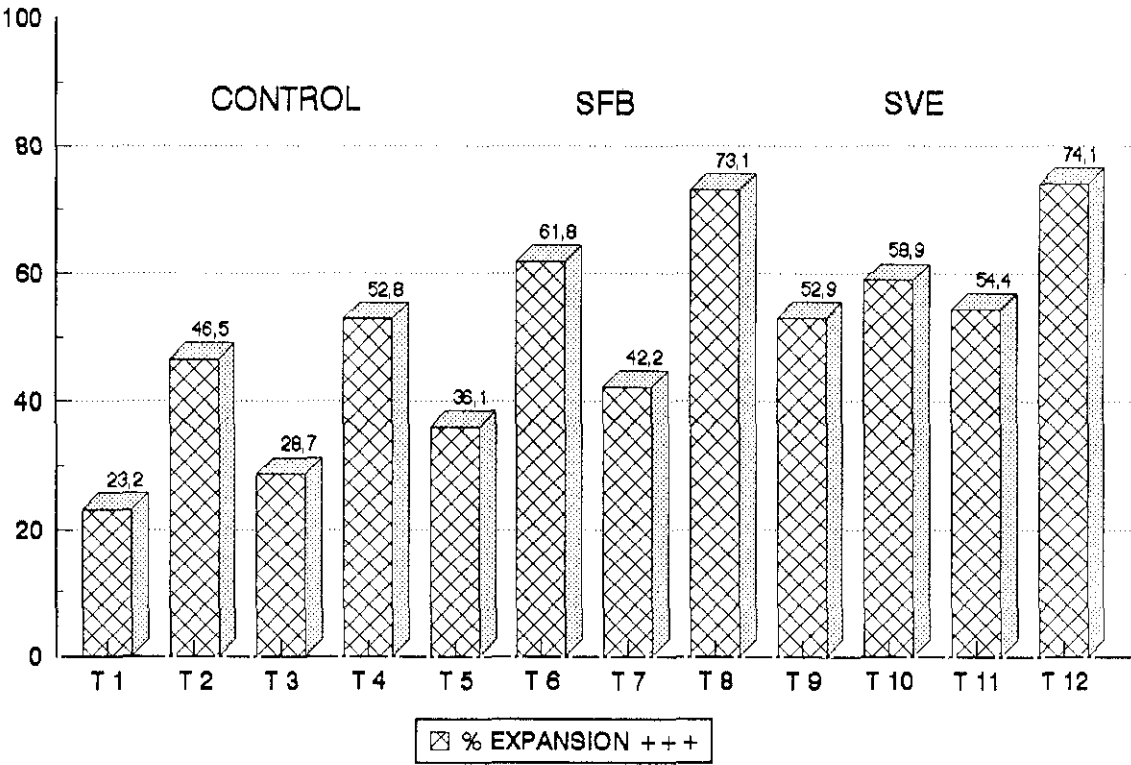
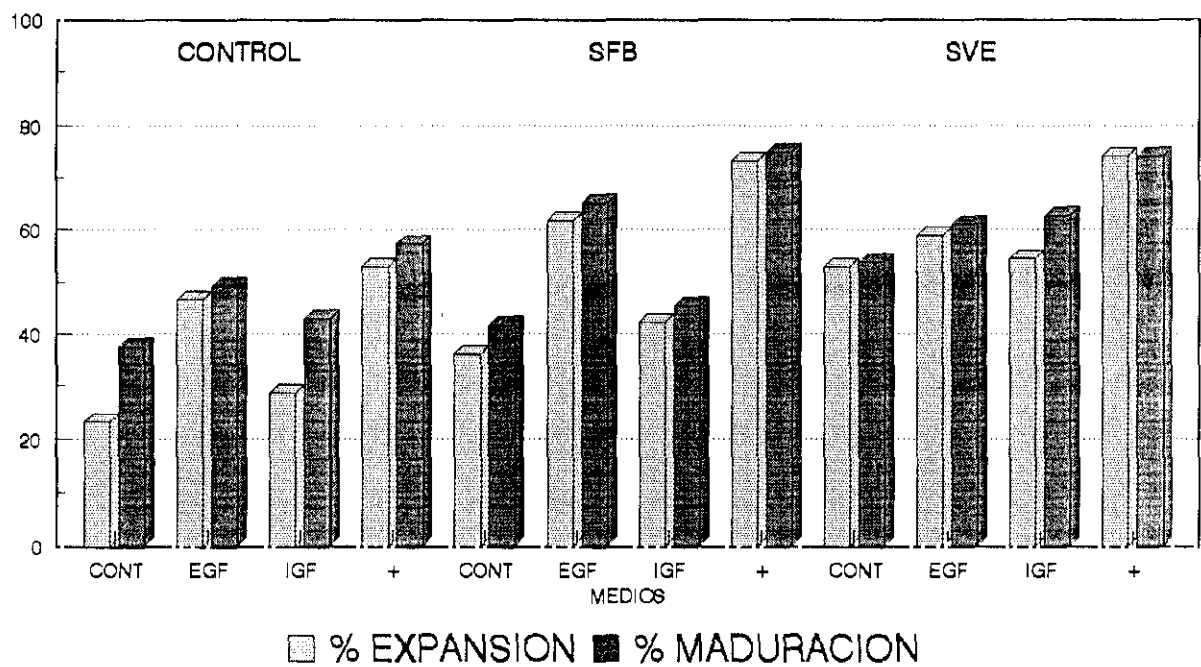


Tabla 9.- Porcentaje de oocitos expandidos y madurados en los tratamientos de maduración in vitro

SUERO n° oocitos	FAC. CREC. n° oocitos	EXPANSION + + + n (% \pm S.E.M.)	MADURADOS n (% \pm S.E.M.)
CONTROL n=350	CONTROL (80)	19 (23,2 \pm 1,9)	29 (37,6 \pm 4,2)
	EGF (92)	43 (46,5 \pm 1,3)	45 (49,1 \pm 1,6)
	IGF-1 (87)	25 (28,7 \pm 2,7)	46 (42,9 \pm 9,5)
	EGF+IGF-1 (91)	49 (52,8 \pm 11,4)	53 (57,3 \pm 10,4)
SFB n=368	CONTROL (83)	30 (36,1 \pm 6,1)	34 (41,8 \pm 6,1)
	EGF (101)	62 (61,3 \pm 3,5)	65 (65,1 \pm 3,1)
	IGF-1 (91)	40 (42,2 \pm 7,2)	52 (45,4 \pm 7,8)
	EGF+IGF-1 (93)	68 (73,1 \pm 6,2)	72 (74,9 \pm 4,8)
SVE n=378	CONTROL (87)	40 (45,9 \pm 8,3)	41 (53,7 \pm 8,0)
	EGF (98)	56 (57,1 \pm 5,8)	58 (61,1 \pm 5,4)
	IGF-1 (89)	48 (54,1 \pm 8,1)	57 (62,8 \pm 7,7)
	EGF+IGF-1 (104)	79 (75,9 \pm 8,6)	80 (74,2 \pm 7,9)

Gráfico 1.- Expansión del cumulo y maduración in vitro en los tratamientos de maduración



Experimento 2. Efecto de las células del cúmulo, los factores de crecimiento y los tipos de sueros en la maduración *in vitro*.

Las **tablas 10, 11 y 12** exponen los resultados relativos al experimento de maduración *in vitro*. Las cifras mostradas corresponden a los estadios meióticos (ver capítulo de MATERIAL Y METODOS) que alcanzaron los oocitos después de 24 horas de maduración *in vitro*. La **Tabla 10** muestra los resultados obtenidos por los oocitos del tipo A, la **Tabla 11** los del tipo B y la **Tabla 12** para los del tipo C. Los valores ofrecidos son el resultado de 7 repeticiones del experimento por tratamiento, excepto en el tratamiento 2 de los oocitos del tipo B, y en los tratamientos 4, 6 y 13 de los oocitos del tipo C, en los que el experimento se repitió 6 veces. Las cifras mostradas en el estadio de metafase I son la suma de las obtenidas en los estadios de metafase, anafase y telofase I.

Los mayores índices de maduración *in vitro* en los oocitos del tipo A, se obtuvieron cuando se empleó EGF+IGF-1 con SFB (tratamiento 10) y con SVE (tratamiento 15), alcanzando valores del 77,6% y 75,9%, respectivamente. Estas cifras fueron, además, las más altas alcanzadas en todo el experimento.

Los mejores resultados de maduración, para los oocitos del tipo B (71,5% y 69,9%), se consiguieron con el tratamiento 15 (SVE+EGF+IGF-1) y con el tratamiento 14 (SVE+IGF-1), respectivamente. El mayor porcentaje de maduración para oocitos del tipo C (49,7% y 48,9%) se alcanzó utilizando el tratamiento 9 (SFB+IGF-1) y el tratamiento 15 (SVE+EGF+IGF-1), respectivamente.

En dichas tablas también se puede observar que el número de oocitos que permanecen en el estadio de vesícula germinal, es mayor en aquellos tratamientos que no incluyen ningún tipo de suero. Por otra parte, dentro de los grupos de tratamientos suplementados con suero, el número de oocitos que permanecieron en el estadio de GV fueron menores en aquellos tratamientos que incluyeron ambos factores de crecimiento en el medio de maduración (tratamientos 10 y 15). Este hecho fue constante para los tres tipos de oocitos.

Tabla 10.- Estados de maduración (% \pm S.E.M.) en los tratamientos de maduración *in vitro* en los oocitos de tipo A

	n	Deg.	GV	MI	M II
T 1	86	16,8 \pm 3,3	24,9 \pm 6,4	21,8 \pm 3,1	36,5 \pm 3,5
T 2	97	10,6 \pm 1,4	13,6 \pm 2,7	35,4 \pm 1,5	40,4 \pm 3,5
T 3	118	9,3 \pm 1,4	5,5 \pm 1,7	31,9 \pm 3,2	53,3 \pm 4,4
T 4	85	13,3 \pm 2,4	7,7 \pm 2,3	30,3 \pm 3,5	48,7 \pm 4,1
T 5	141	11,9 \pm 2,2	2,0 \pm 1,4	25,8 \pm 4,3	60,3 \pm 3,7
T 6	126	5,9 \pm 1,6	18,6 \pm 2,1	33,8 \pm 4,7	41,7 \pm 4,1
T 7	101	7,0 \pm 2,1	2,7 \pm 1,3	28,0 \pm 4,3	62,3 \pm 2,2
T 8	124	5,5 \pm 1,9	4,5 \pm 1,2	24,1 \pm 3,2	65,9 \pm 1,4
T 9	151	5,8 \pm 1,3	8,3 \pm 1,7	27,7 \pm 6,1	58,2 \pm 4,6
T 10	134	5,8 \pm 1,2	2,9 \pm 1,4	13,7 \pm 3,1	77,6 \pm 2,2
T 11	115	8,8 \pm 0,9	10,1 \pm 1,5	35,5 \pm 2,9	45,6 \pm 4,4
T 12	104	6,1 \pm 1,9	1,9 \pm 1,3	38,7 \pm 5,1	53,3 \pm 2,3
T 13	105	4,1 \pm 1,6	3,3 \pm 1,7	25,0 \pm 4,1	67,6 \pm 5,2
T 14	146	5,1 \pm 1,5	5,8 \pm 1,6	24,5 \pm 2,7	64,6 \pm 3,1
T 15	161	2,3 \pm 1,2	3,4 \pm 1,4	18,4 \pm 3,9	75,9 \pm 2,3

Tabla 11.- Estadios de maduración (% \pm S.E.M.) en los tratamientos de maduración in vitro en los oocitos tipo B

	n	Deg.	GV	M I	M II
T 1	80	18,6 \pm 2,1	19,2 \pm 2,3	31,5 \pm 5,6	30,7 \pm 1,5
T 2	79	14,1 \pm 2,3	6,3 \pm 2,3	36,4 \pm 3,1	43,2 \pm 3,3
T 3	104	10,3 \pm 1,6	5,9 \pm 1,8	27,2 \pm 3,9	56,6 \pm 2,2
T 4	85	11,0 \pm 2,4	9,5 \pm 3,9	32,4 \pm 3,2	47,1 \pm 5,2
T 5	130	9,8 \pm 2,2	1,7 \pm 1,1	33,2 \pm 4,1	55,3 \pm 1,6
T 6	90	6,4 \pm 1,8	20,1 \pm 3,1	31,6 \pm 3,9	41,9 \pm 1,8
T 7	103	6,4 \pm 1,9	2,7 \pm 1,3	36,6 \pm 1,8	54,3 \pm 3,9
T 8	132	6,5 \pm 1,5	1,4 \pm 1,4	35,3 \pm 3,1	56,8 \pm 5,0
T 9	101	7,3 \pm 1,4	6,3 \pm 1,7	23,1 \pm 2,3	63,3 \pm 3,6
T 10	100	7,3 \pm 1,8	1,8 \pm 1,9	30,8 \pm 2,9	60,1 \pm 1,2
T 11	97	9,5 \pm 1,1	9,2 \pm 2,2	31,3 \pm 3,6	50,0 \pm 1,9
T 12	99	4,7 \pm 1,3	7,1 \pm 1,9	36,4 \pm 3,0	51,8 \pm 3,5
T 13	69	4,3 \pm 2,0	3,8 \pm 2,6	37,4 \pm 2,1	54,5 \pm 4,4
T 14	154	5,1 \pm 1,1	9,4 \pm 2,1	15,6 \pm 3,1	69,9 \pm 5,2
T 15	150	1,8 \pm 0,8	1,2 \pm 0,8	25,5 \pm 1,3	71,5 \pm 2,0

Tabla 12.- Estadios de maduración (% \pm S.E.M.) en los tratamientos de maduración in vitro en los oocitos tipo C

	n	Deg.	GV	M I	M II
T 1	59	21,9 \pm 3,4	15,8 \pm 3,0	28,0 \pm 3,1	34,3 \pm 6,4
T 2	86	14,0 \pm 1,4	15,0 \pm 3,8	30,4 \pm 6,2	40,6 \pm 4,9
T 3	107	15,8 \pm 1,9	10,0 \pm 2,1	28,7 \pm 1,5	45,5 \pm 4,2
T 4	114	14,8 \pm 1,8	14,5 \pm 1,8	25,3 \pm 2,1	45,4 \pm 3,9
T 5	144	12,3 \pm 1,3	5,7 \pm 1,1	40,4 \pm 5,9	41,6 \pm 2,0
T 6	103	7,3 \pm 1,6	20,8 \pm 2,6	34,7 \pm 2,5	37,2 \pm 2,6
T 7	60	6,5 \pm 3,1	5,0 \pm 3,4	46,9 \pm 3,7	41,6 \pm 4,6
T 8	99	6,6 \pm 2,5	7,6 \pm 1,7	40,8 \pm 5,1	45,0 \pm 2,4
T 9	114	8,2 \pm 1,0	14,5 \pm 1,6	27,6 \pm 1,3	49,7 \pm 2,8
T 10	140	6,5 \pm 0,9	5,8 \pm 0,8	41,4 \pm 7,5	46,3 \pm 1,6
T 11	109	10,1 \pm 2,0	19,1 \pm 2,0	31,9 \pm 3,1	38,9 \pm 2,2
T 12	123	6,5 \pm 1,9	7,3 \pm 1,9	43,9 \pm 2,2	42,3 \pm 2,1
T 13	66	5,5 \pm 2,5	5,8 \pm 1,9	51,1 \pm 4,2	37,6 \pm 7,2
T 14	116	8,4 \pm 1,8	7,7 \pm 1,5	37,9 \pm 2,7	46,0 \pm 4,9
T 15	170	7,0 \pm 2,3	6,1 \pm 1,8	38,0 \pm 1,9	48,9 \pm 1,9

A) Efecto de las células del cúmulo.

Las diferencias entre los porcentajes de maduración *in vitro* conseguidos por los distintos tipos de oocitos, según el número de capas del cúmulo celular que le rodean, se muestran en las **Tablas 13, 14 y 15**.

Estas tablas indican que, las diferencias en los porcentajes de maduración, fueron muy evidentes entre los oocitos que tenían cúmulo celular (tipos A y B) frente a los desnudos (tipo C).

La **Tabla 13** indica las variaciones en el porcentaje de maduración existente entre los oocitos de los tipos A y B. Estas variaciones fueron mucho más acusadas cuando se utilizaron los dos tipos de sueros y la adición de los dos factores de crecimiento (tratamientos 10 y 15).

Las diferencias en el porcentaje de maduración, entre los oocitos de los tipos A y C, se muestran en la **Tabla 14**. En todos los tratamientos se presentaron variaciones muy significativas excepto en tres casos: en el tratamiento sin sueros ni factores de crecimiento (tratamiento 1), en el tratamiento con EGF 20 pero sin suero (tratamiento 2) y cuando se utilizó SFB+IGF-1 (tratamiento 9).

La **Tabla 15** señala las variaciones que existieron entre los tipos B y C. Estos fueron más evidentes, sobre todo, en los tratamientos que incorporaron EGF+IGF-1 (tratamientos 5, 10 y 15).

Tabla 13.- Efecto de las células del cúmulo en
 los tratamientos de maduración in vitro
 entre los oocitos A y B

	OOCITO TIPO A % ± S.E.M.	OOCITO TIPO B % ± S.E.M.	SIGNIFICACION ESTADISTICA
T 1	36,5 ± 3,5	30,7 ± 1,5	**
T 2	40,4 ± 3,5	43,2 ± 3,3	-
T 3	53,3 ± 4,4	56,6 ± 2,2	*
T 4	48,7 ± 4,1	47,2 ± 5,2	-
T 5	60,3 ± 3,7	55,3 ± 1,6	-
T 6	41,7 ± 4,1	41,9 ± 1,8	-
T 7	62,3 ± 2,2	54,3 ± 3,9	-
T 8	65,9 ± 1,4	56,8 ± 5,0	*
T 9	58,2 ± 4,6	63,3 ± 3,6	-
T 10	77,6 ± 2,2	60,1 ± 1,2	**
T 11	45,6 ± 4,4	50,0 ± 1,9	*
T 12	53,3 ± 2,3	51,8 ± 3,5	-
T 13	67,6 ± 5,2	54,5 ± 4,4	*
T 14	64,6 ± 3,1	69,9 ± 5,2	-
T 15	75,9 ± 2,3	71,5 ± 2,0	**

** p<0,01 * p<0,05 - p>0,05

Tabla 14.- Efecto de las células del cúmulo en los tratamientos de maduración in vitro entre los oocitos tipo A y C

	OOCITO TIPO A % \pm S.E.M.	OOCITO TIPO C % \pm S.E.M.	SIGNIFICACION ESTADISTICA
T 1	36,5 \pm 3,5	34,3 \pm 6,4	-
T 2	40,4 \pm 3,5	40,6 \pm 4,9	-
T 3	53,3 \pm 4,4	45,5 \pm 4,1	*
T 4	48,7 \pm 4,1	45,4 \pm 3,9	*
T 5	60,3 \pm 3,7	41,6 \pm 2,0	**
T 6	41,7 \pm 4,1	37,2 \pm 2,6	*
T 7	62,3 \pm 2,2	41,6 \pm 4,6	**
T 8	65,9 \pm 1,4	45,0 \pm 2,4	***
T 9	58,2 \pm 4,6	49,7 \pm 2,8	-
T 10	77,6 \pm 2,2	46,3 \pm 1,6	***
T 11	45,6 \pm 4,4	38,9 \pm 2,2	*
T 12	53,3 \pm 2,3	42,3 \pm 2,1	**
T 13	67,6 \pm 5,2	37,6 \pm 7,2	**
T 14	64,6 \pm 3,1	46,0 \pm 4,9	**
T 15	75,9 \pm 2,3	48,9 \pm 1,9	***

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ - $p > 0,05$

Tabla 15.- Efecto de las células del cúmulo en los tratamientos de maduración in vitro entre los oocitos de tipo B y C

	OOCITO TIPO B % \pm S.E.M.	OOCITO TIPO C % \pm S.E.M	SIGNIFICACION ESTADISTICA
T 1	30,7 \pm 1,5	34,3 \pm 6,4	-
T 2	43,2 \pm 3,3	40,6 \pm 4,9	-
T 3	56,6 \pm 2,2	45,5 \pm 4,2	*
T 4	47,2 \pm 5,2	45,4 \pm 3,9	-
T 5	55,3 \pm 1,6	41,6 \pm 2,0	***
T 6	41,9 \pm 1,8	37,2 \pm 2,6	-
T 7	54,3 \pm 3,9	41,6 \pm 4,6	*
T 8	56,8 \pm 5,0	45,0 \pm 2,5	*
T 9	63,3 \pm 3,6	49,7 \pm 2,8	*
T 10	60,1 \pm 1,2	46,3 \pm 1,6	***
T 11	50,0 \pm 1,9	38,9 \pm 2,2	**
T 12	51,8 \pm 3,5	42,3 \pm 2,1	-
T 13	54,5 \pm 4,4	37,6 \pm 7,2	*
T 14	69,9 \pm 5,2	46,0 \pm 4,9	**
T 15	71,5 \pm 2,0	48,9 \pm 1,9	***

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ - $p > 0,05$

B) Efecto de los FC.

Las **Tablas 16, 17 y 18** señalan las diferencias estadísticas encontradas entre los distintos tratamientos según el factor de crecimiento utilizado. Dentro del **grupo control**, los porcentajes de maduración *in vitro*, fueron mayores en los tratamientos con EGF+IGF-1 (tratamiento 5) en los oocitos de los tipos A y B (**Tablas 16 y 17**). Estos valores presentaron, además, una alta significación estadística frente a los otros tratamientos, excepto en los oocitos del tipo C (**Tabla 18**), en los que no existieron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos del grupo control. Además, en los tipos A y B, el tratamiento con EGF 50, presentó también porcentajes de maduración significativamente mas altos que cuando se utilizaron EGF 20 e IGF-1.

En el **grupo de tratamientos con SFB**, y también en los tipos de oocitos A y B, se alcanzaron valores de maduración significativamente superiores que en el resto de los tratamientos con EGF+IGF-1). Según muestran las **Tablas 16 y 17**, todos los factores de crecimiento utilizados, aumentaron, significativamente, el porcentaje de maduración, respecto del tratamiento que solamente tiene SFB (Tratamiento 6). Este hecho sólomente ocurrió en los oocitos de tipo A y B. En el tipo C (**Tabla 18**), existieron diferencias significativas al utilizar el EGF 50, IGF-1 y EGF+IGF-1, todos ellos respecto del tratamiento control (Tratamiento 6); la utilización de 20 ng/ml de EGF no supuso ninguna diferencia significativamente respecto al tratamiento con SFB.

En el **grupo de tratamientos que incluyeron SVE**, la adición de ambos factores de crecimiento (EGF+IGF-1) conjuntamente con el SVE (tratamiento 15), permitió alcanzar el mayor porcentaje de maduración, en los oocitos del tipo A, de una manera significativa respecto al resto de los tratamientos de este grupo (**Tabla 16**). En los tipos B y C (**Tablas 17 y 18**), este tratamiento también fue el mejor, aunque no significativo, respecto del 14 (SVE+IGF-1). Además del tratamiento que emplea los dos factores de crecimiento, el que presentó un porcentaje de maduración significativamente más alto que el resto de los tratamientos en los oocitos tipo A, fue

Tabla 16.- Nivel de significación entre los tratamientos de maduración in vitro de oocitos de tipo A

CONTROL	T 2	T 3	T 4	T 5
T 1	-	*	*	***
T 2		*	-	***
T 3			-	-
T 4				*

SFB	T 7	T 8	T 9	T 10
T 6	**	***	**	***
T 7		-	-	***
T 8			**	***
T 9				**

SVE	T 12	T 13	T 14	T 15
T 11	-	**	**	***
T 12		*	**	***
T 13			*	**
T 14				**

*** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05 - p>0,05

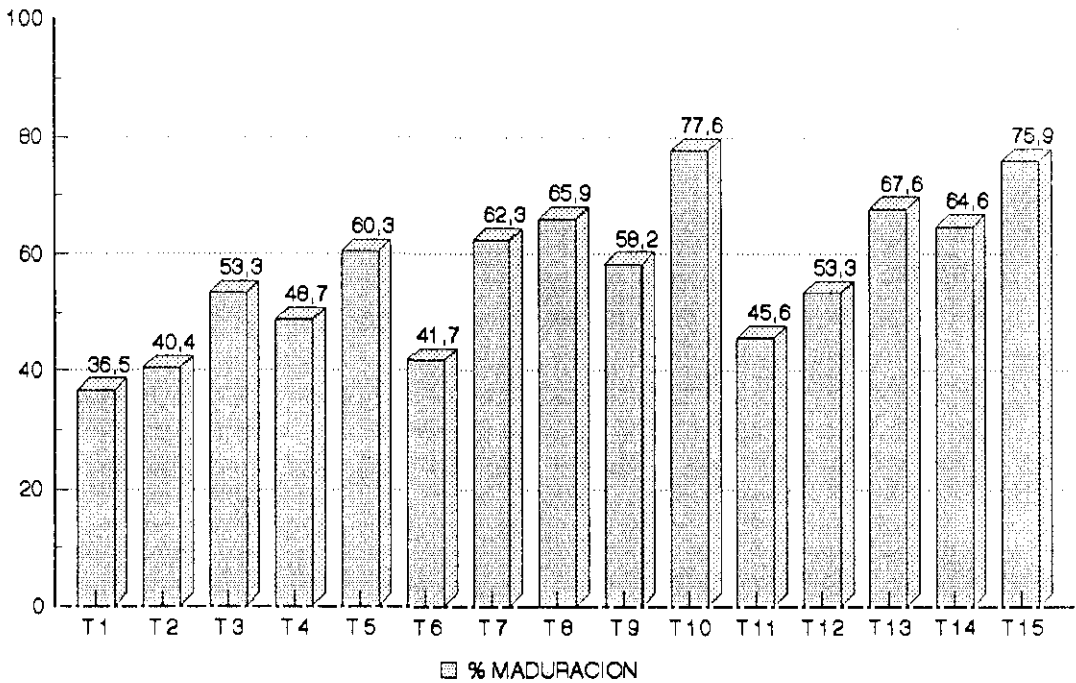


Tabla 17.- Nivel de significación entre los tratamientos de maduración in vitro de oocitos de tipo B

CONTROL	T 2	T 3	T 4	T 5
T 1	**	***	*	***
T 2		**	-	**
T 3			-	-
T 4				-

SFB	T 7	T 8	T 9	T 10
T 6	*	*	***	***
T 7		-	-	-
T 8			-	*
T 9				*

SVE	T 12	T 13	T 14	T 15
T 11	-	-	**	**
T 12		-	*	*
T 13			*	*
T 14				-

*** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05 - p>0,05

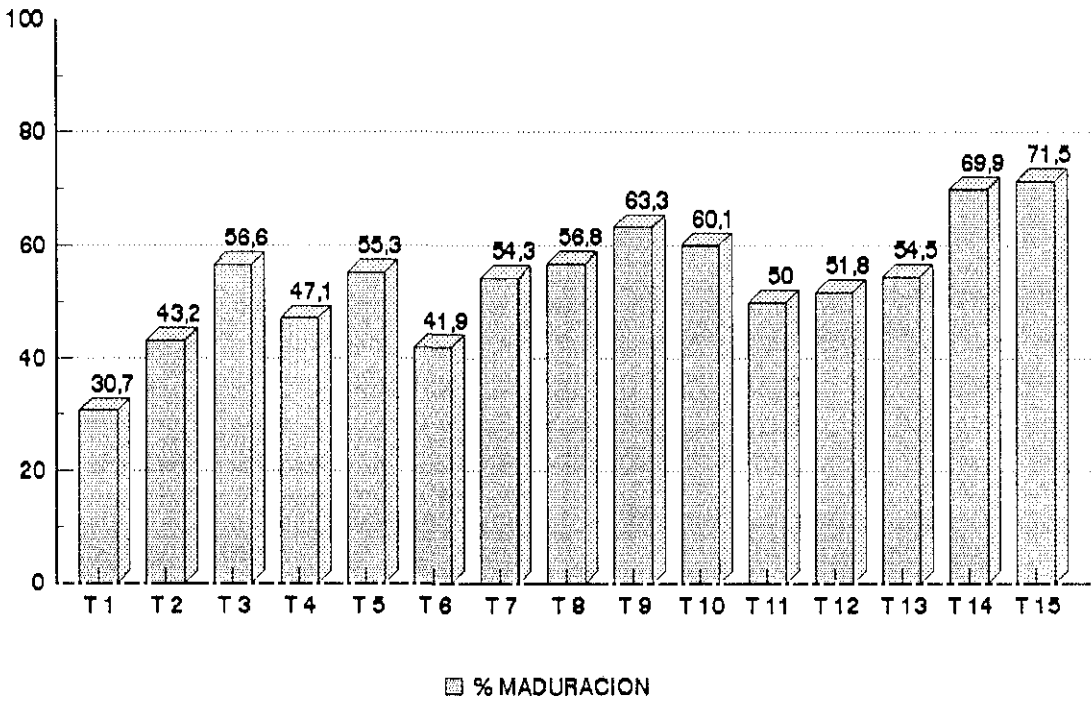


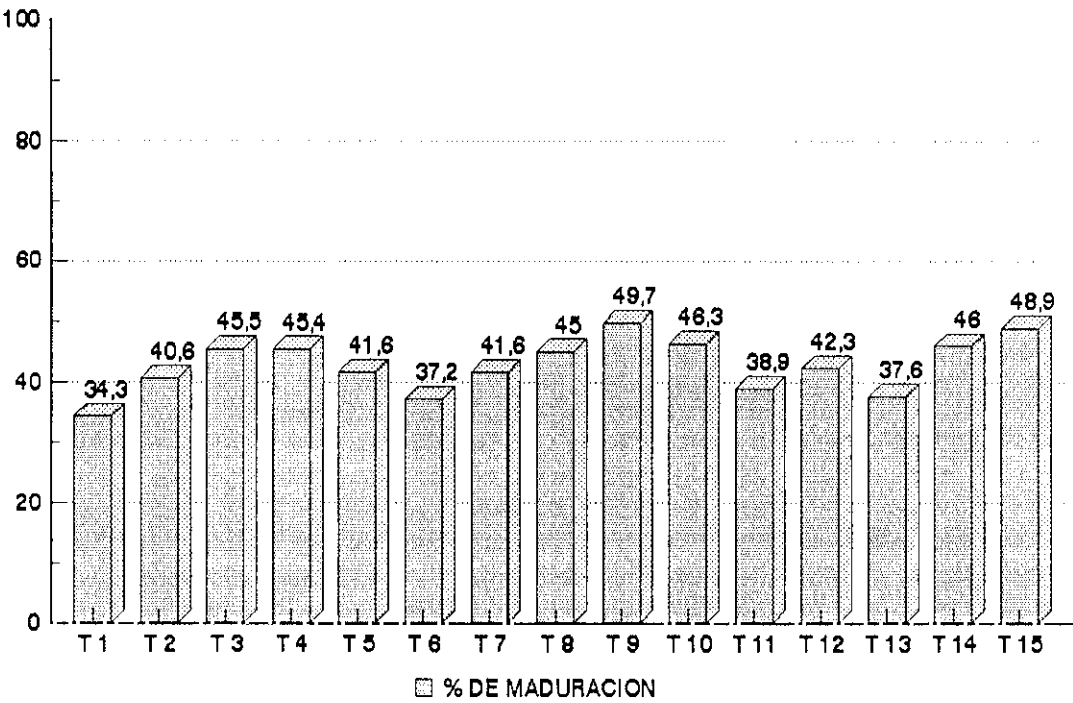
Tabla 18.- Nivel de significación entre los tratamientos de maduración in vitro de oocitos de tipo C

CONTROL	T 2	T 3	T 4	T 5
T 1	-	-	-	-
T 2		-	-	-
T 3			-	-
T 4				-

SFB	T 7	T 8	T 9	T 10
T 6	-	*	**	*
T 7		-	-	-
T 8			-	-
T 9				-

SVE	T 12	T 13	T 14	T 15
T 11	-	-	-	**
T 12		*	-	*
T 13			-	*
T 14				-

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ - $p > 0,05$



el que tuvo EGF 20, mientras que, en los oocitos tipo B y C, el que incluyó IGF-1 (T 14) fue el que presentó un valor más elevado.

C) Efecto del suero.

En las Tablas 19, 20 y 21, se observan las diferencias en los porcentajes de maduración, respecto al suero utilizado y a la significación estadística existente; en estas tablas, se indican los datos obtenidos para los tipos de oocitos A, B y C, respectivamente.

En los oocitos del tipo A (Tabla 19), el porcentaje de maduración fue mayor en el grupo de tratamientos con SFB que en el grupo sin suero (grupo control). Esta diferencia fue significativa cuando se utilizó EGF 20, EGF 50 y EGF+IGF-1. En el grupo con SVE, todos los tratamientos presentaron un índice de maduración mayor que en el grupo control, siendo estas diferencias significativas en todos los casos. La comparación entre los dos grupos de tratamientos que incluyeron sueros, SFB frente al SVE, no presentó diferencias significativas, salvo en el caso del tratamiento con EGF 20, que presentó mayores porcentajes de maduración *in vitro* cuando se utilizó combinado con SFB.

La respuesta de los oocitos del tipo B (Tabla 20) difirió ligeramente de la que presentaron los del tipo A. Las diferencias entre el grupo de tratamientos sin suero y con SFB sólo fueron significativas en los tratamientos sin factores de crecimiento y cuando se utilizó EGF+IGF-1. Por otro lado, al igual que ocurrió en los oocitos del tipo A, los valores que presentó el grupo de tratamientos con SVE fueron todos significativamente mayores que los del grupo sin suero. En lo que respecta a la diferencia entre ambos grupos de tratamientos con sueros, sólo existieron porcentajes de maduración significativamente más elevados cuando se utilizó SVE en los tratamientos sin factores de crecimiento y, sobre todo, en el tratamiento con EGF+IGF-1.

Como demuestra la **Tabla 21**, los oocitos tipo C no mostraron ninguna diferencia significativa cuando se utilizó cualquier tipo de suero, ni entre los tratamientos del grupo control y los de los grupos con sueros, ni entre los grupos con sueros entre sí, a excepción de un leve aumento del porcentaje de maduración en el tratamiento con SVE+EGF+IGF-1 respecto al mismo tratamiento sin suero.

Por último, **Gráfico 2** permite observar la evolución conjunta de los tres tipos morfológicos de oocitos, de acuerdo con el porcentaje de maduración alcanzado y el tratamiento empleado. Como se puede observar, los oocitos del tipo A presentaron, en la mayoría de los tratamientos, un porcentaje de maduración mayor que en los otros dos tipos, especialmente, en los tratamientos 10 y 15. Los oocitos del tipo B tuvieron un comportamiento semejante a los del tipo A solamente en algunos de los tratamientos (T 3, T 6 y T 14), mientras que, los oocitos del tipo C, tuvieron cifras de maduración sensiblemente más bajas que los otros dos tipos.

Tabla 19.- Nivel de significación del efecto de los sueros
en los tratamientos de maduración in vitro en los
oocitos tipo A (% \pm S.E.M.)

	CONTROL	SFB	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	36,5 \pm 3,5	41,7 \pm 4,1	-
EGF 20	40,4 \pm 3,5	62,3 \pm 2,2	***
EGF 50	53,3 \pm 4,4	65,9 \pm 1,4	**
IGF-1 100	48,7 \pm 4,1	58,2 \pm 4,6	-
EGF+IGF-1	60,3 \pm 6,7	77,6 \pm 2,2	**

	CONTROL	SVE	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	36,5 \pm 3,5	45,6 \pm 4,4	*
EGF 20	40,4 \pm 3,5	53,3 \pm 2,3	**
EGF 50	53,3 \pm 4,4	67,6 \pm 5,2	***
IGF-1 100	48,7 \pm 4,1	64,6 \pm 3,1	***
EGF+IGF-1	60,3 \pm 3,7	75,9 \pm 2,3	***

	SFB	SVE	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	41,7 \pm 4,1	45,6 \pm 4,4	-
EGF 20	62,3 \pm 2,2	53,3 \pm 2,3	**
EGF 50	65,9 \pm 1,4	67,6 \pm 5,2	-
IGF-1 100	58,2 \pm 4,6	64,6 \pm 3,1	-
EGF+IGF-1	77,6 \pm 2,2	75,9 \pm 2,3	-

*** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ - $p > 0,05$

**Tabla 20.- Nivel de significación del efecto de los sueros
en los tratamientos de maduración in vitro en los
oocitos tipo B (% \pm S.E.M.)**

	CONTROL	SFB	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	30,7 \pm 1,5	41,9 \pm 1,8	**
EGF 20	43,2 \pm 3,3	54,3 \pm 3,9	-
EGF 50	56,6 \pm 2,2	56,8 \pm 5,0	-
IGF-1 100	47,1 \pm 5,2	63,3 \pm 3,6	-
EGF+IGF-1	55,3 \pm 1,6	60,1 \pm 1,2	*

	CONTROL	SVE	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	30,7 \pm 1,5	50,0 \pm 1,9	***
EGF 20	43,2 \pm 3,3	51,8 \pm 3,5	***
EGF 50	56,6 \pm 2,2	54,5 \pm 4,4	***
IGF-1 100	47,1 \pm 5,2	69,9 \pm 5,2	***
EGF+IGF-1	55,3 \pm 1,6	71,5 \pm 2,0	***

	SFB	SVE	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	41,9 \pm 1,8	50,0 \pm 1,9	**
EGF 20	54,3 \pm 3,9	51,8 \pm 3,5	-
EGF 50	56,8 \pm 5,0	54,5 \pm 4,4	-
IGF-1 100	63,3 \pm 3,6	69,9 \pm 5,2	-
EGF+IGF-1	60,1 \pm 1,2	71,5 \pm 2,0	***

*** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05 - p>0,05

**Tabla 21.- Nivel de significación del efecto de los sueros
en los tratamientos de maduración in vitro en los
oocitos tipo C (% \pm S.E.M.)**

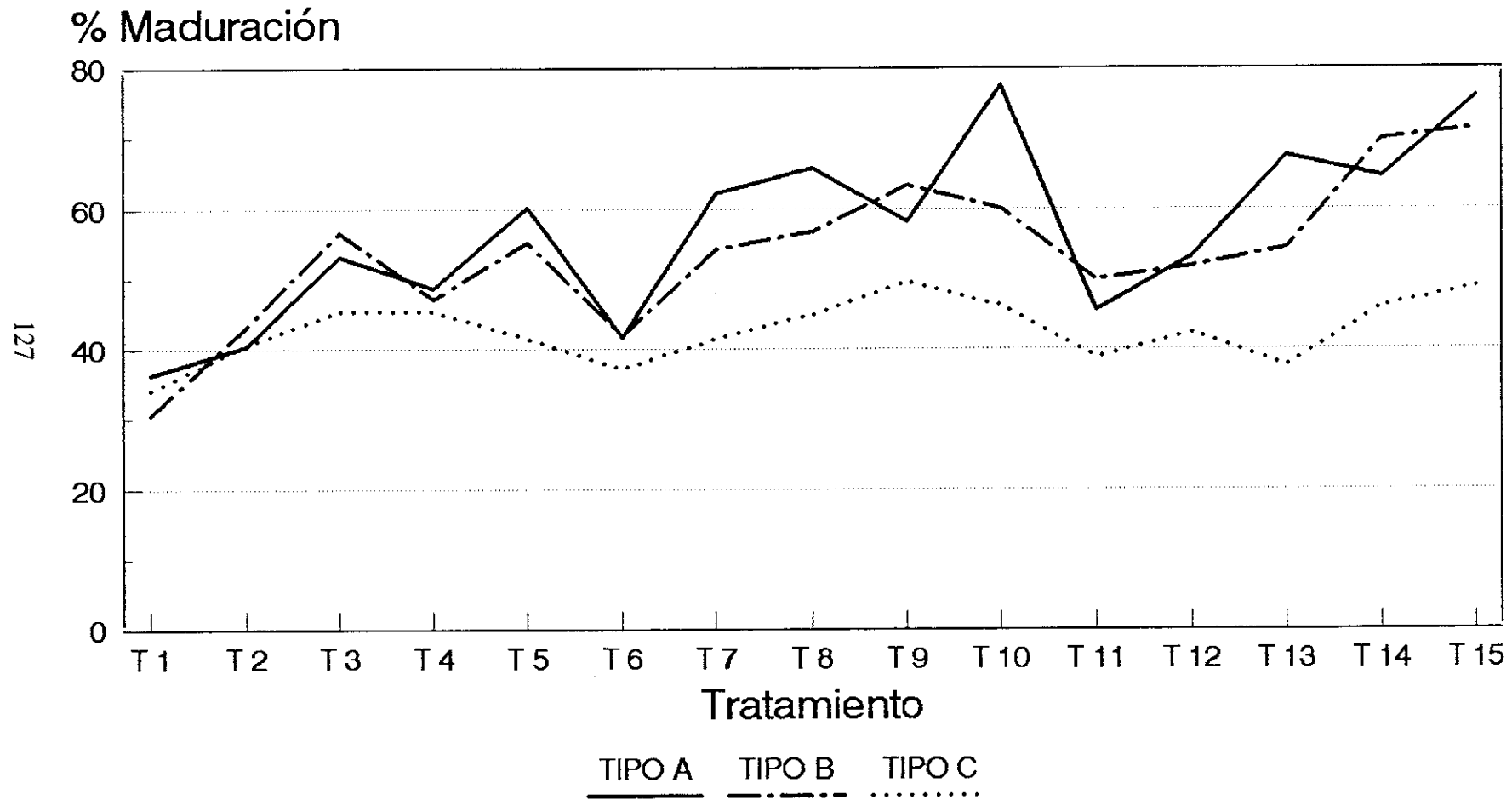
	CONTROL	SFB	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	34,2 \pm 6,4	37,2 \pm 2,6	-
EGF 20	40,6 \pm 4,9	41,6 \pm 4,6	-
EGF 50	45,5 \pm 4,2	45,0 \pm 2,4	-
IGF-1 100	45,4 \pm 3,9	49,7 \pm 2,8	-
EGF+IGF-1	41,6 \pm 2,0	46,3 \pm 1,6	-

	CONTROL	SVE	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	34,3 \pm 6,4	38,9 \pm 2,2	-
EGF 20	40,6 \pm 4,9	42,3 \pm 2,1	-
EGF 50	45,5 \pm 4,2	37,6 \pm 7,2	-
IGF-1 100	45,4 \pm 3,9	46,0 \pm 4,9	-
EGF+IGF-1	41,6 \pm 2,0	48,9 \pm 1,9	*

	SFB	SVE	SIGNIFICACION ESTADISTICA
CONTROL	37,2 \pm 2,6	38,9 \pm 2,2	-
EGF 20	41,6 \pm 4,6	42,3 \pm 2,1	-
EGF 50	45,0 \pm 2,4	37,6 \pm 7,2	-
IGF-1 100	49,7 \pm 2,8	46,0 \pm 4,9	-
EGF+IGF-1	46,3 \pm 1,6	48,9 \pm 1,9	-

*** p<0,001 ** p<0,01 * p<0,05 - p>0,05

Gráfico 2.- Maduración in vitro en los distintos
tratamientos en los oocitos de los tipos A,B y C



PRUEBAS DE FECUNDACION *IN VITRO*.

Experimentos 1 y 2. Efecto las células del cúmulo y del suero y los factores de crecimiento en la fecundación *in vitro*.

En las Tablas 22, 23 y 24, se exponen los resultados obtenidos en los experimentos correspondientes a la fecundación *in vitro* de los oocitos tipo A, B y C respectivamente. Los valores ofrecidos se refieren a 13 repeticiones del experimento. Los parámetros expuestos en dichas tablas son:

% *Pre M-II*. - Es el porcentaje del cociente entre los oocitos que, al término del periodo de fecundación, presentaron configuraciones meióticas degenerativas o anteriores a la de metafase II (GV, M-I, A-I y T-I) y el total de los oocitos empleados en el experimento.

% *Madur/n*. - Los oocitos denominados "madur" (maduros) son aquellos oocitos que presentaron estadios de metafase II, pronúcleos (PN) y poliespermia (Polis). El % *Madur/n* expresa el porcentaje del cociente entre éstos y el total de los oocitos.

% *PN/n*. - Es el porcentaje del cociente entre los oocitos que presentaron pronúcleos y el total de los oocitos utilizados.

% *Polis/n*. - Similar al anterior, pero teniendo en cuenta solamente a los oocitos que demostraron poliespermia.

% *Pen/n*. - Indicado como el porcentaje del cociente entre la suma de los oocitos que presentaron pronúcleos y poliespermia y el total de los oocitos empleados.

% Poliespermia.- Expresa el cociente entre el número de oocitos poliespérmicos y el de los oocitos designados maduros.

% Penetración.- Definido como el porcentaje del cociente entre la suma de los oocitos que presentan pronúcleos y poliespermia y el total de oocitos maduros.

% Fecundación o Fecundación normal.- En este caso, sólo se expresa el cociente entre los oocitos con pronúcleos y el total de los maduros.

Como se puede observar, en las tablas anteriormente mencionadas, los valores más altos para los porcentajes de penetración y fecundación, correspondieron a los oocitos del tipo A (70,4% y 43,3% respectivamente, **Tabla 22**), y los más bajos, a los oocitos del tipo C (32,6% y 18,9% respectivamente, **Tabla 24**).

La **Tabla 25**, indica la significación estadística del efecto del suero y los factores de crecimiento en la fecundación. Como se puede ver, en los oocitos de los tipos A y B, el porcentaje de fecundación aumentó, muy significativamente, cuando los oocitos maduraron en presencia de sueros y factores de crecimiento, frente a los oocitos madurados en el medio control, sin suero ni factores de crecimiento. La diferencias, entre los distintos tipos de sueros, sólo fueron significativas en uno de los parámetros evaluados (poliespermia) cuando se utilizó SFB como suero, pero sólo en los oocitos con cúmulo celular.

Tabla 22.- Fecundación in vitro (% \pm S.E.M.) en
oocitos de tipo A

	CONTROL n= 94	SFB \pm FC n= 237	SVE \pm FC n= 201
% Pre-M II	64,6 \pm 6,1	33,5 \pm 2,9	46,6 \pm 2,1
% Madur/n	35,4 \pm 4,2	66,5 \pm 3,3	53,4 \pm 2,3
% PN/n	4,2 \pm 1,6	28,6 \pm 2,7	29,8 \pm 2,3
% Polis/n	5,3 \pm 2,0	17,5 \pm 2,9	7,2 \pm 1,3
% PEN/n	9,5 \pm 2,9	46,1 \pm 1,8	36,9 \pm 2,8
% Poliespermia	14,9 \pm 5,8	27,1 \pm 4,5	13,5 \pm 2,3
% Penetración	26,9 \pm 8,8	70,4 \pm 2,6	69,3 \pm 4,3
% Fecundación	12,1 \pm 4,8	43,3 \pm 3,8	55,8 \pm 3,8

Tabla 23.- Fecundación in vitro (% \pm S.E.M.) en
oocitos de tipo B

	CONTROL n= 85	SFB \pm FC n= 205	SVE \pm FC n= 210
% Pre-M II	68,1 \pm 7,5	52,3 \pm 2,3	52,1 \pm 1,6
% Madur/n	31,9 \pm 5,5	47,7 \pm 2,9	47,9 \pm 3,5
% PN/n	4,4 \pm 2,0	14,6 \pm 1,3	17,0 \pm 2,4
% Polis/n	6,3 \pm 8,8	13,5 \pm 1,3	7,6 \pm 1,7
% PEN/n	10,8 \pm 3,5	28,1 \pm 2,0	24,6 \pm 3,3
% Poliespermia	14,9 \pm 6,2	28,6 \pm 2,1	15,8 \pm 3,5
% Penetración	30,1 \pm 9,8	59,5 \pm 3,3	50,5 \pm 5,7
% Fecundación	15,3 \pm 8,5	30,9 \pm 2,7	34,7 \pm 4,7

Tabla 24.- Fecundación in vitro (% \pm S.E.M.) en
oocitos de tipo C

	CONTROL n= 81	SFB \pm FC n= 209	SVE \pm FC n= 173
% Pre-M II	73,5 \pm 7,8	63,2 \pm 5,4	62,5 \pm 6,9
% Madur/n	26,5 \pm 3,0	36,8 \pm 2,9	37,5 \pm 3,0
% PN/n	3,3 \pm 1,8	7,3 \pm 1,6	3,3 \pm 1,1
% Polis/n	4,6 \pm 2,4	5,7 \pm 1,9	4,5 \pm 1,3
% PEN/n	7,9 \pm 2,6	13,1 \pm 2,3	7,8 \pm 2,0
% Poliespermia	15,4 \pm 8,7	13,7 \pm 4,3	12,7 \pm 3,6
% Penetración	30,8 \pm 10,6	32,6 \pm 2,8	22,2 \pm 2,5
% Fecundación	15,4 \pm 8,7	18,9 \pm 4,1	9,5 \pm 3,2

Tabla 25.- Nivel de significación del efecto del suero y los factores de crecimiento en los medios de maduración en la fecundación in vitro

			SFB + FC	SVE + FC
OOCITOS TIPO A	% FECUNDADOS	CONTROL	**	***
		SFB + FC		-
	% POLIESPERMIA	CONTROL	-	-
		SFB + FC		*
	% PENETRACION	CONTROL	***	***
		SFB + FC		-
OOCITOS TIPO B	% FECUNDADOS	CONTROL	*	***
		SFB + FC		-
	% POLIESPERMIA	CONTROL	*	-
		SFB + FC		*
	% PENETRACION	CONTROL	*	*
		SFB + FC		-
OOCITOS TIPO C	% FECUNDADOS	CONTROL	-	-
		SFB + FC		-
	% POLIESPERMIA	CONTROL	-	-
		SFB + FC		-
	% PENETRACION	CONTROL	-	-
		SFB + FC		-

*** P<0,001 ** P<0,01 * P<0,05 - P>0,05

El efecto del cúmulo en la *poliespermia* se muestra en la **Tabla 26**. En ella se observa un aumento significativo de la misma, cuando se empleó como suero el SFB, pero sólo en los oocitos con capas del cúmulo celular (tipos A y B) y no en oocitos desnudos, además, se presentaron diferencias muy acusadas con respecto a estos oocitos sin cúmulo (tipo C).

La **Tabla 27** expresa el efecto del cúmulo en el porcentaje de *penetración* de los oocitos. En ella se advierte que los oocitos del tipo A presentaron valores más altos de penetración que los de los otros dos tipos cuando se utilizaron los sueros y los factores de crecimiento en el medio de maduración y, sobre todo, al utilizar SFB.

En cuanto al porcentaje de *fecundación* normal (**Tabla 28**), el valor más alto lo presentaron los oocitos del tipo A que maduraron en un medio con SVE+ factores de crecimiento. Estos valores, presentaron una diferencia significativa frente a los oocitos del tipo B y, sobre todo, con los del tipo C, que mostraron valores de fecundación sensiblemente inferiores a los de los otros dos tipos.

La presencia del cúmulo celular produjo, en los tratamientos con sueros y factores de crecimiento, un aumento considerable en los tres parámetros señalados en los puntos anteriores (poliespermia, penetración y fecundación), comparado con los oocitos sin la presencia del cúmulo celular.

Tabla 26.- Nivel de significación del efecto del cúmulo celular en la poliespermia (% \pm S.E.M.) en los oocitos madurados in vitro

	OOCITO TIPO A	OOCITO TIPO B	SIGNIFICACION
CONTROL	14,9 \pm 5,8	14,9 \pm 6,2	-
SFB + FC	27,1 \pm 4,5	28,6 \pm 2,1	-
SVE + FC	13,5 \pm 2,3	15,8 \pm 3,5	-
	OOCITO TIPO A	OOCITO TIPO C	SIGNIFICACION
CONTROL	14,9 \pm 5,8	15,4 \pm 8,7	-
SFB + FC	27,1 \pm 4,5	13,7 \pm 4,3	*
SVE + FC	13,5 \pm 2,3	12,7 \pm 3,6	-
	OOCITO TIPO B	OOCITO TIPO C	SIGNIFICACION
CONTROL	14,9 \pm 6,2	15,4 \pm 8,7	-
SFB + FC	28,6 \pm 2,1	13,7 \pm 4,3	*
SVE + FC	15,8 \pm 3,5	12,7 \pm 3,6	-

* P<0,05 - P>0,05

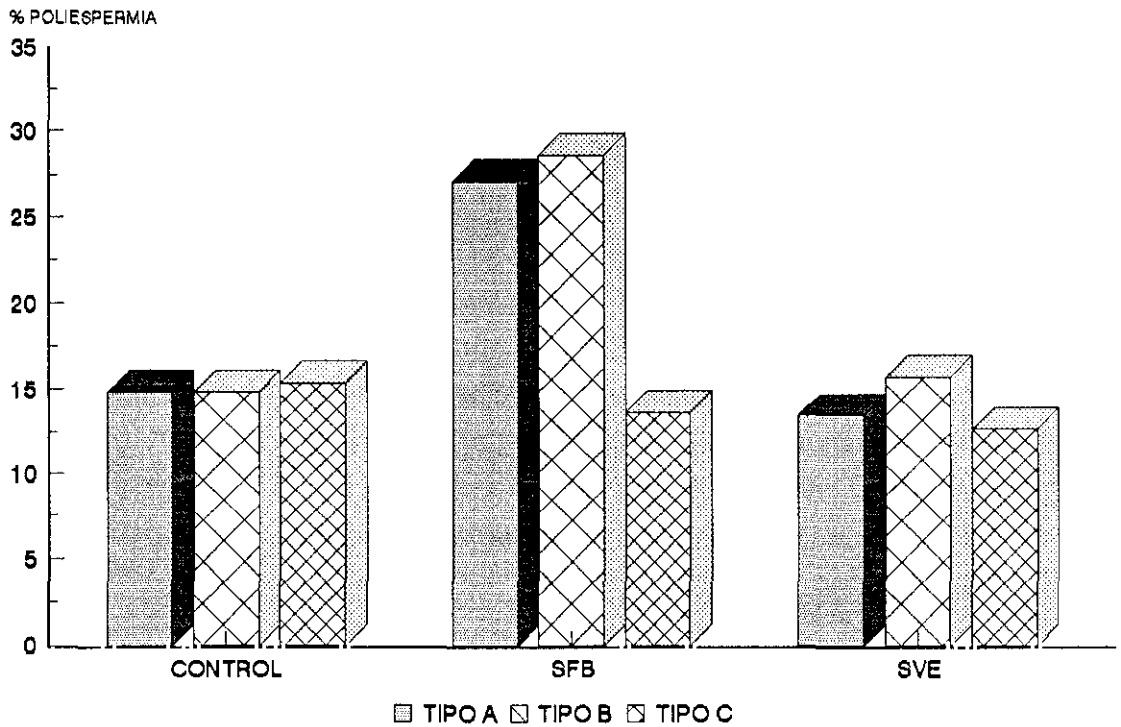


Tabla 27.- Nivel de significación del efecto del cúmulo celular en la penetración (% \pm S.E.M.) en los oocitos madurados in vitro

	OOCITO TIPO A	OOCITO TIPO B	SIGNIFICACION
CONTROL	26,9 \pm 8,8	30,1 \pm 9,8	-
SFB + FC	70,4 \pm 2,6	59,5 \pm 3,3	-
SVE + FC	69,3 \pm 4,3	50,5 \pm 5,7	*
	OOCITO TIPO A	OOCITO TIPO C	SIGNIFICACION
CONTROL	26,9 \pm 8,8	30,8 \pm 10,6	-
SFB + FC	70,4 \pm 2,6	32,6 \pm 4,8	**
SVE + FC	69,3 \pm 4,3	22,2 \pm 2,5	***
	OOCITO TIPO B	OOCITO TIPO C	SIGNIFICACION
CONTROL	30,1 \pm 9,8	30,8 \pm 10,6	-
SFB + FC	59,5 \pm 3,3	32,6 \pm 4,8	*
SVE + FC	50,5 \pm 5,7	22,2 \pm 2,5	*

*** P<0,001 ** P<0,01 * P<0,05 - P>0,05

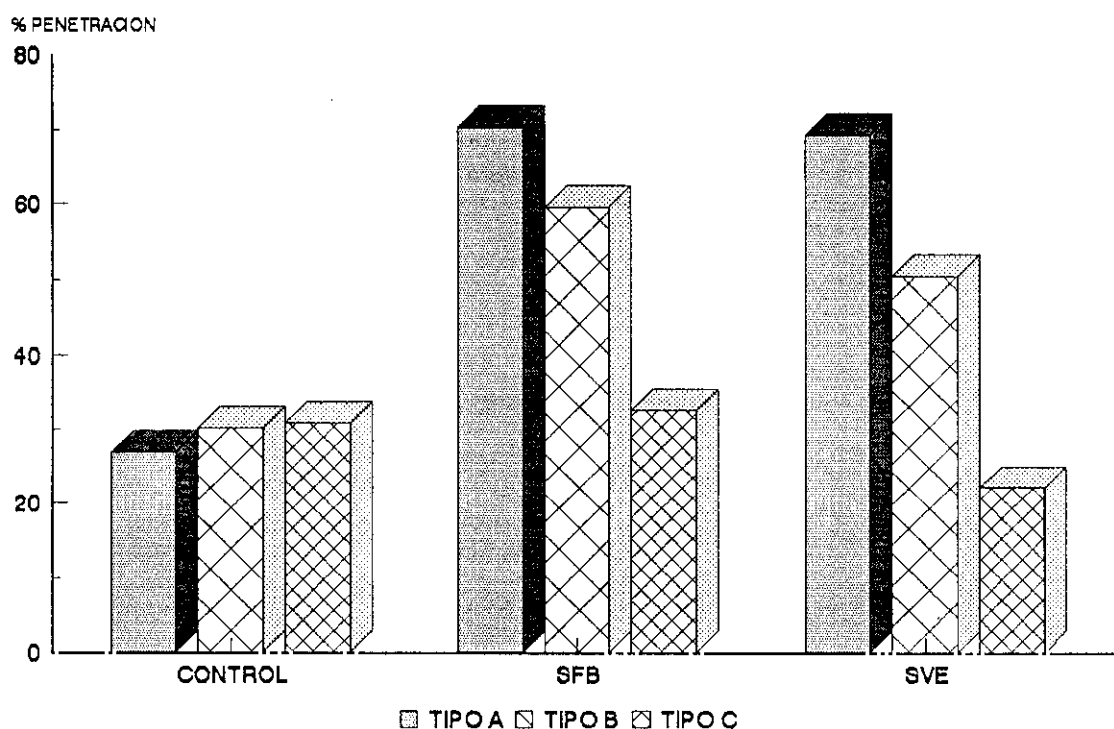
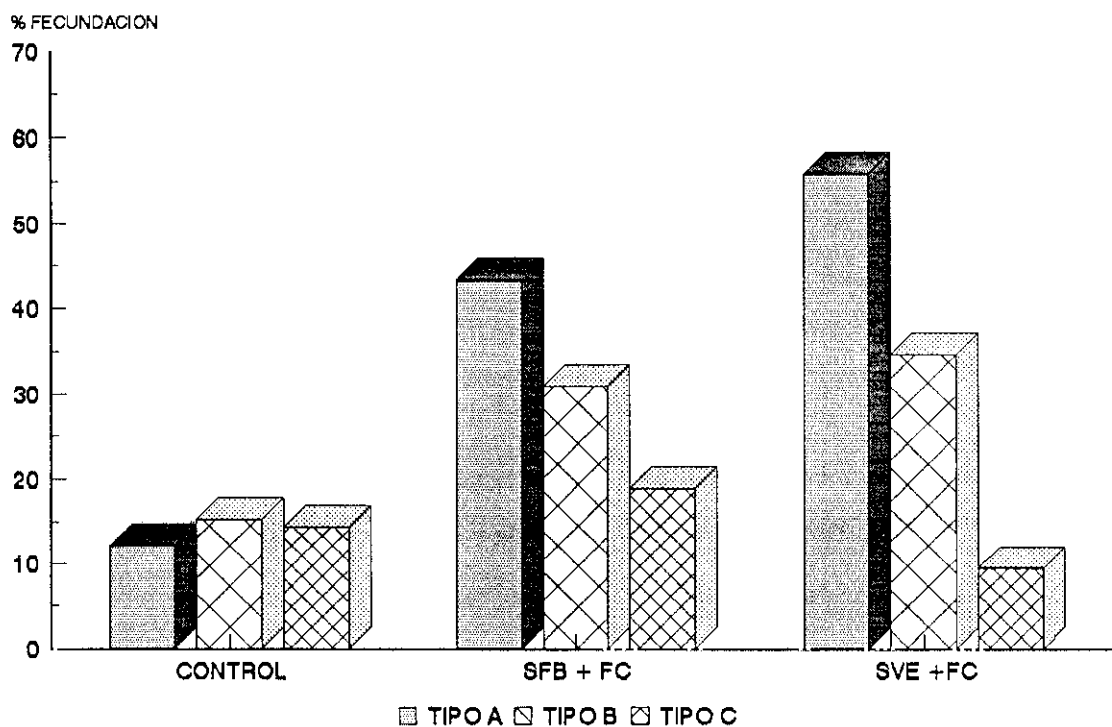


Tabla 28.- Nivel de significación del efecto del cúmulo celular en la fecundación (% \pm S.E.M.) de oocitos madurados in vitro

	OOCITO TIPO A	OOCITO TIPO B	SIGNIFICACION
CONTROL	12,1 \pm 4,8	15,3 \pm 8,5	-
SFB + FC	43,3 \pm 3,8	30,9 \pm 2,7	-
SVE + FC	55,8 \pm 3,8	34,7 \pm 4,7	*
	OOCITO TIPO A	OOCITO TIPO C	SIGNIFICACION
CONTROL	12,1 \pm 4,8	15,4 \pm 8,7	-
SFB + FC	43,3 \pm 3,8	18,9 \pm 4,1	**
SVE + FC	55,8 \pm 3,8	9,5 \pm 3,2	***
	OOCITO TIPO B	OOCITO TIPO C	SIGNIFICACION
CONTROL	15,3 \pm 8,5	15,4 \pm 8,7	-
SFB + FC	30,9 \pm 2,7	18,9 \pm 4,1	*
SVE + FC	34,7 \pm 4,7	9,5 \pm 3,2	*

*** P<0,001 ** P<0,01 * P<0,05 - P>0,05



DISCUSSION

5.- DISCUSION.

Los oocitos bovinos se encuentran detenidos, desde antes del nacimiento, en la profase de la primera división meiótica y sólomente continuarán este proceso de división cuando llegue la oleada de gonadotropinas, previa a la ovulación. El desarrollo de los oocitos inmaduros en los folículos ováricos hasta llegar a ser oocitos maduros (en el estadio de metafase II) es dependiente de muchos factores reguladores, tanto intraováricos como extraováricos (Tonetta y DiZerega, 1986). Los esteroides foliculares y las gonadotropinas, han demostrado intervenir en todos estos mecanismos, pero son insuficientes, por si mismos, para completar la totalidad de estos procesos (DiZerega *et al.*, 1983; Hammond *et al.*, 1985).

Las gonadotropinas, añadidas a medios de maduración *in vitro*, han conseguido aumentar los índices de maduración y fecundación *in vitro* (Moor y Trounson, 1977; Fukui *et al.*, 1982; Fukui y Ono, 1989). El folículo ovárico no sólomente responde a las concentraciones de dichas hormonas, sino que también es sensible a los factores de crecimiento intraováricos (que actúan de una manera autocrina/paracrina) cuya inclusión, en los medios de maduración *in vitro*, en oocitos de animales de laboratorio, ha demostrado poseer efectos estimulatorios (Deckel y Serizly, 1986; Feng *et al.*, 1988; Downs, 1989).

Por otro lado, los suplementos proteicos de los medios también han demostrado jugar un papel importante en estos sistemas de cultivo, estableciéndose que la presencia de las macromoléculas aportadas por el suero, son muy beneficiosas para el desarrollo y maduración del oocito (Xu *et al.*, 1986; Sanbuissho y Threlfall, 1989). Los papeles que puedan jugar estos dos grupos de componentes, factores de crecimiento y sueros, en los sistemas de maduración y fecundación *in vitro* de oocitos bovinos, son un paso más para aclarar, en lo posible, los mecanismos que intervienen en estos procesos.

1.- OBTENCION DE OVARIOS Y OOCITOS.

Todos los ovarios empleados en este trabajo se consiguieron de vacas sacrificadas en matadero. La disponibilidad de animales en el matadero nos permitió elegir, en lo posible, la edad de los animales sacrificados, escogiendo novillas como objeto de nuestra experimentación; aunque hay algunos autores que señalan que novillas y vacas adultas, con más de tres años, tienen las mismas posibilidades de que sus oocitos maduren *in vitro* (Katska y Smorag, 1984), la mayoría de los autores señalan, por el contrario, que los ovarios de novillas contienen menos folículos atrésicos y oocitos degenerados y que, además, los oocitos procedentes de estos ovarios tienen un mejor comportamiento en los sistemas de fecundación *in vitro* y desarrollo embrionario posterior. Además, en nuestro caso, experimentos previos demostraron que las vacas de más de tres años tuvieron unos índices de maduración *in vitro* significativamente peores que los provenientes de animales más jóvenes.

La obtención de los ovarios desde que los animales fueron sacrificados fue lo más rápida posible y, desde este momento, se intentó mantener la temperatura constante (ya que las oscilaciones térmicas pueden dañar a los oocitos, First y Parrish, 1987) en todos los pasos de los procesos de maduración y fecundación *in vitro*. Por esta razón, se transportaron los ovarios en un termo con PBS a 38°C, de acuerdo a lo que señalan otros autores (First y Parrish, 1987). El tiempo empleado en trasladar los ovarios hasta el laboratorio también es un parámetro importante y la mayoría de los trabajos publicados hacen referencia a un tiempo inferior a las 5 horas (Katska y Smorag, 1984; First y Parrish, 1987); en nuestro caso, por estar el matadero relativamente cercano a nuestro laboratorio, se tardaba, normalmente, un tiempo inferior a la hora y media desde la obtención de los ovarios hasta llegar al laboratorio. Cuando los ovarios van a permanecer un tiempo almacenados antes de su utilización -por ejemplo si el matadero se encuentra muy lejos del laboratorio- es preferible conservarlos a 20°C, ya que, se ha demostrado que manteniéndolos a 39°C o 4°C se producían peores resultados de maduración y fecundación que a 20°C (Yang *et al.*, 1990).

El traslado de los ovarios se efectúa normalmente en soluciones salinas con una suplementación de antibióticos, para evitar en lo posible la proliferación bacteriana. Otros autores han empleado simples soluciones salinas fisiológicas para este traslado (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987; Sirard, 1989) pero en cualquier caso siempre suplementada con antibióticos. En nuestro trabajo se prefirió hacerlo con PBS a 38-39°C ya que, además de la temperatura, juzgamos importante la capacidad tampón de esta solución para impedir oscilaciones bruscas del pH.

a.- Obtención de los oocitos.

La recuperación del mayor número posible de oocitos a partir de los folículos ováricos, depende de varios factores. El primero de ellos es el tamaño folicular elegido. La mayoría de los autores escogen folículos con diámetros comprendidos entre 2 y 8 mm, ya que son los que tienen oocitos capaces de madurar *in vitro* con mayor garantía (Fukui y Sakuma, 1980; Motlik y Fulka, 1986); folículos de este tamaño son los que se han empleado en este trabajo.

En la bibliografía consultada, los autores muestran sus preferencias a la hora de obtener los oocitos, valorando unos y otros, la conveniencia de utilizar la punción y aspiración del contenido folicular o emplear la disección y ruptura de los folículos.

La disección de los folículos ováricos tiene la ventaja de obtener un índice de recuperación elevado -entre folículos diseccionados/oocitos obtenidos-, superior al 90% (Katska, 1984; Lonergan *et al.*, 1991; Pavlov *et al.*, 1992), frente a los valores obtenidos por aspiración que, en las mejores condiciones, se encuentran cercanos al 70% (Lonergan *et al.*, 1991; Herlerr *et al.*, 1992); sin embargo, la disección folicular, tiene dos inconvenientes: i) el tiempo empleado para obtener los oocitos y ii) la calidad de los mismos con vistas a la maduración *in vitro*.

En cuanto al primer punto, en nuestro trabajo se eligió la aspiración folicular porque se consideró, como factor muy importante, la rapidez en la obtención de los oocitos ya que, este proceso, exige que las condiciones de temperatura y pH varíen

lo menos posible desde que se obtienen los ovarios hasta que los oocitos se introducen en el medio de maduración. Por otro lado, la ventaja que supone la disección de folículos en la totalidad del ovario y, de este modo, conseguir un mayor número de oocitos, queda neutralizada frente a la técnica de la aspiración de folículos, aunque sean superficiales, al señalar, varios autores que, los oocitos obtenidos por disección, tienen una capacidad de madurar y desarrollarse *in vitro* menor que los procedentes de la punción y aspiración folicular (Arlotto *et al.*, 1990; Takagi *et al.*, 1992).

El número de folículos aspirados en nuestra experiencia fue 8,3 de media por ovario. Este resultado, está de acuerdo con los valores obtenidos por algunos autores (Katska, 1984; Herlerr *et al.*, 1992), e incluso es ligeramente mayor al de 6,3/ovario señalado por otros (Pavlov *et al.*, 1992); aunque, también, es ligeramente inferior al indicado en otros trabajos, que han obtenido un número de 14,6 folículos/ovario (Lonergan *et al.*, 1991); la mayoría de estos estudios, indican que existe una marcada variabilidad en el número de folículos aspirados por ovario, que también se presentó en nuestro trabajo debido, probablemente, a las diferentes procedencias y condiciones de los animales que llegan al sacrificio en el matadero.

El producto de la aspiración folicular se puso en tubos cónicos de centrífuga de 15 ml, y de aquí, sedimentaron y se recogieron los oocitos. Este es el mismo procedimiento utilizado por Leibfried y First (1979) y Sirard (1989); además, permite una obtención rápida de los oocitos y evita tener que examinar la totalidad del líquido folicular obtenido después de la aspiración, lo que presenta una ventaja frente a la utilización de placas Petri para la recogida de los oocitos.

Como **medio de lavado** de los oocitos se empleó el mismo medio (M-199) que en la maduración *in vitro* posterior, suplementado con un pequeño volumen de SFB (2%) y con sales de HEPES (25 mM); la presencia de suero tuvo por objeto asegurar el aporte proteico de los oocitos durante el tiempo que se tardó en lavarlos y seleccionarlos mientras que, las sales de HEPES, tuvieron por objeto mantener el pH del medio dentro de los valores fisiológicos, ya que, sin CO₂, estas sales tienen

un comportamiento tampón mejor que el del bicarbonato sódico, que es el que se utiliza en el medio de maduración.

En nuestro trabajo se utilizaron cinco lavados de los oocitos antes de incorporarlos al medio de maduración *in vitro*. Este es un número superior a los tres lavados que emplean otros autores (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987; Sirard *et al.*, 1989) y similar al utilizado por otros (Younis *et al.*, 1989; Fukui, 1990) ya que, de acuerdo con estos últimos, nos pareció fundamental eliminar, en todo lo posible, elementos foliculares que impiden o dificultan la maduración, como el líquido folicular, sangre, células de descamación, etc.

El porcentaje de recuperación de oocitos fue, en nuestras experiencias, del 66,9%. Este valor, es similar al 66,4% obtenido por Lonnergan *et al.* (1991) y ligeramente inferior al 69,9% mostrado por Herlerr *et al.* (1992); sin embargo, los porcentajes de nuestro trabajo, son superiores que el 54,3% y 43,2%, indicados por Fukui y Sakuma (1980) y Katska (1984), respectivamente. En ello puede influir la elección del método de aspiración, ya que, estos últimos autores emplearon agujas de 22 y 21 G, que tienen diámetros más estrechos que las de 18 G empleadas en nuestro trabajo y por los autores que obtuvieron más de un 65% de recuperación.

El tipo y porcentaje de oocitos seleccionados, para el cultivo de maduración *in vitro*, varía según los diversos autores. Aquellos que sólo emplean oocitos con cúmulo completo y más de 6 capas de células (que en nuestro estudio se han denominado oocitos de tipo A), señalan que, los porcentajes de selección, son del 65% de los oocitos recogidos (Berg y Brem, 1990), 57% (Fukui, 1989), 45% (Katska, 1984), 40% (Katska y Smorag, 1984), 36,5% (Herrler *et al.*, 1992), 32% (Lonnergan *et al.*, 1991) y 20,1% (Arlotto *et al.*, 1990). En nuestro trabajo, se seleccionaron un 24,6% de oocitos del tipo A, respecto del total de los oocitos conseguidos tras la aspiración folicular, y el total de los oocitos seleccionados (de los tipos A, B y C) fue de un 40,7% respecto del total de los oocitos obtenidos. Este número es inferior del que obtuvieron Lonnergan *et al.* (1991) para los mismos tipos morfológicos, ya que consiguieron un 57,1% de oocitos de los tres tipos; sin

embargo, estos mismos autores, no llevaron a cabo una selección posterior de los oocitos, para descartar aquellos que no sean aptos para la maduración, hecho que en nuestro estudio se consideró fundamental ya que, prácticamente todos los autores, señalan que la selección de los oocitos antes de la maduración *in vitro* es muy importante para asegurar el éxito de la misma (Leibfried y First, 1979; Fukui y Sakuma, 1980; First y Parrish, 1987; Gordon, 1990; Herlerr *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio señalan que, después de la selección y clasificación de los distintos tipos de oocitos, los porcentajes de obtención, respecto del total de oocitos seleccionados, fueron de un 37,7% para los oocitos de tipo A, 32,1% para los del B y 29,1% para los del C. Estos valores, para los tipos B y C, son superiores a los que obtuvieron Katska y Smorag (1984), pero similares a los datos aportados por Lonergan *et al.*, (1991). Otros autores, (Xu *et al.*, 1987; Fukui, 1990), utilizan también en sus trabajos varios tipos morfológicos de oocitos, clasificados de acuerdo a las características del cúmulo celular, pero no muestran, en dichos trabajos, los datos relativos a los porcentajes de recuperación y selección de los distintos tipos de oocitos.

En cuanto al número de oocitos obtenidos por ovario, los resultados mostrados por los distintos trabajos consultados ofrecen mucha variabilidad. Algunos autores exponen en sus resultados, un número de oocitos/ovario de 11,1 (Sato *et al.*, 1990), 4,9 (Funakashi *et al.*, 1991), 14,6 (Lonergan *et al.*, 1992) y 8,9 (Takagi *et al.*, 1992). Todos estos resultados se refieren a oocitos con cúmulo, lo que en nuestro trabajo denominamos oocitos de tipos A y B. Los resultados de nuestro estudio, 2,4 oocitos con cúmulo/ovario, fueron análogos a los descritos por otros autores, que mostraron cifras de 2,5 (Arlotto *et al.*, 1990) y 2,1 (Herlerr *et al.*, 1992). Probablemente, estas diferencias entre unos y otros autores, se deban, a las características de las hembras sacrificadas en el matadero y, sobre todo, a una mayor selección de los oocitos recogidos tras la punción folicular, antes de introducirlos en el medio de maduración *in vitro*.

La clasificación de los oocitos para la maduración *in vitro* se hizo de acuerdo al número de capas que presentó el cúmulo celular. Se efectuó de esta manera para tratar de evaluar, en lo posible, si la selección de los oocitos, en base a esta cualidad morfológica y dependiendo de las características del medio de cultivo empleado, podía influir tanto en la maduración como en la fecundación *in vitro*. Este objetivo ha sido estudiado por diversos autores, aunque con algunas variaciones respecto a la clasificación del cúmulo celular y la composición de los medios de cultivo empleados en nuestra experimentación (Xu *et al.*, 1986; Lonergan *et al.*, 1991; De Loos *et al.*, 1992). En cualquier caso, los oocitos, cualesquiera que fuera el tipo de cúmulo celular, fueron seleccionados en base a la integridad del cúmulo y citoplasma, cuestión que la mayoría de los autores establecen prioritaria y fundamental antes de comenzar el cultivo de maduración *in vitro* (Xu *et al.*, 1986 y 1987; Shioya *et al.*, 1988; Younis *et al.*, 1989; Lonergan *et al.*, 1991; De Loos *et al.*, 1992; Herlerr *et al.*, 1992).

b.- Medio de cultivo.

El medio base de maduración *in vitro* de nuestro trabajo fue el M-199 suplementado con sales de Earle que es, con mucho, el medio más utilizado por los distintos autores para conseguir la maduración *in vitro* de oocitos de ganado vacuno. En este trabajo, se ha utilizado una modificación de la formulación original del medio, descrito por Morgan (1950), basada en la adición sales de Earle y glutamina, de igual manera a la descrita por Lu *et al.* (1987) y una suplementación de bicarbonato sódico (Eng *et al.*, 1990), con el fin de procurar un aporte energético al oocito y mantener un pH dentro de los valores fisiológicos.

El medio se dispuso en forma de microgotas cubiertas con aceite de silicona líquido. Se eligió este método porque uno de los objetivos fundamentales de las distintas experimentaciones de maduración y fecundación *in vitro*, fue evaluar las diferencias existentes entre los tres tipos morfológicos de oocitos clasificados, lo que exigía un aislamiento entre ellos que solamente se podía lograr mediante el uso de

microgotas; el volumen fue de 50 μ l por su facilidad de manejo y se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro, en lugar de las placas de 3 cm empleadas por otros autores, ya que, podían contener un mayor número de microgotas de acuerdo con el número de oocitos empleado, sin ser excesivamente grandes para manejarlas.

Todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo, excepto el medio empleado para lavar el semen, fueron equilibrados en la incubadora de CO₂ durante dos horas, por lo menos, antes del comienzo de los periodos de cultivo. Este tiempo, que en algunas ocasiones incluso fue mayor, aseguró que el medio de cultivo adquiriera -se equilibrara- las características de temperatura y atmósfera gaseosa del ambiente que le rodeaba; de esta manera se procuró que, los oocitos y los espermatozoides, no sufrieran cambios bruscos de sus condiciones fisicoquímicas. Se dispusieron un número de 5 oocitos por microgota que, de acuerdo con otros autores (Shioya *et al.*, 1988; Rose y Bavister, 1992), permitió un aporte de los componentes de los medios adecuado a cada oocito.

c.- Composición de los medios.

Además del medio básico de cultivo (M-199), los distintos tratamientos a los que se sometieron los oocitos para su maduración *in vitro*, estaban suplementados con sueros y factores de crecimiento (exceptuando el tratamiento 1 que sólo se formuló con M-199), en unas cantidades que, seguidamente, se van a indicar:

i) Sueros. Como suplementación de los medios de maduración se utilizaron sueros con el fin de suministrar un aporte proteico al oocito. Se eligió la suplementación con SFB y SVE frente a la del BSA porque esta última no puede soportar el gasto energético que supone la expansión del cúmulo celular (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986), cuya evaluación era, por otro lado, uno de los objetivos experimentales de nuestro trabajo. Los sueros empleados, SFB y SVE, se utilizaron con una concentración del 10% v/v en el medio de cultivo. La elección de esta concentración estuvo fundamentada en los trabajos de diversos autores (Leibfried-

Rutledge *et al.*, 1986; Sanbuissho y Threlfall, 1989; Kim, 1990) que, dentro de unos límites de variación del 10% al 20%, señalaban que la dosis más efectiva era un 10% v/v de suero en el medio. Sanbuissho y Threlfall (1989) señalaron que es más lógico utilizar en los sistemas de maduración SVE que el SFB ya que, en condiciones *in vivo*, el oocito recibe durante la maduración el aporte de sustancias nutritivas maternas de origen sérico.

ii) *Factores de crecimiento*. La dosis empleada por los -pocos- autores que han utilizado EGF en los medios de maduración *in vitro* de oocitos, fue de 25 ng/ml (Dekel y Sherizly, 1985), aunque los primeros señalaban que quizás esta dosis era insuficiente para lograr el máximo efecto posible en la maduración de los oocitos de ratona. En la maduración de oocitos de cerda, Illera *et al.* (1992) utilizaron 50 ng/ml de EGF, con los que han obtenido buenos resultados. Sommer *et al.* (1992) señala, no obstante, en esta misma especie animal, que una concentración más baja de EGF, de 1 a 10 ng/ml, ofrece los mejores resultados. En el ganado vacuno, Sanbuissho *et al.* (1990), utilizaron 5, 10 y 50 ng/ml de EGF en el medio, observando una posible relación dosis-efecto en la maduración *in vitro* de los oocitos cuando aumentó la concentración de EGF en el medio de maduración.

En nuestro estudio, además de tener en cuenta estos trabajos, se eligió la dosis de EGF (20 y 50 ng/ml) debido a la existencia de concentraciones similares en el líquido folicular porcino y humano (Hsu *et al.*, 1987); de este modo, la concentración de EGF empleada en nuestro trabajo, trató de reproducir, en lo posible, los niveles que este factor de crecimiento presenta en condiciones *in vivo*.

En relación a la concentración utilizada de IGF-1 en el medio de maduración *in vitro*, se eligió la dosis de 100 ng/ml que, según demostró Downs (1989), fue la que presentó una mayor eficacia -entre 1, 10 y 100 ng/ml de medio- para inducir la activación de la meiosis en los oocitos de ratona; esta dosis también ha sido empleada por Illera (1992) en oocitos porcinos. Por otro lado, hay que destacar, que Echternkamp *et al.* (1990) mostraron que el líquido folicular vacuno presentaba una concentración de IGF-1 análoga también a la empleada en este trabajo, por lo cual

se eligió esta concentración en el medio de maduración *in vitro* para que, como en el caso del EGF, se imitara en lo posible las concentraciones que el IGF-1 presenta *in vivo*. En estudios recientes donde se ha utilizado IGF-1 como componente del medio de maduración (Herler *et al.*, 1992), se empleó una dosis de 50 ng/ml, aunque en dicho trabajo, se escogió dicha concentración de acuerdo a su influencia sobre los cultivos de células granulosas, no en relación a estudios de maduración *in vitro* de oocitos y, además, sólo se evaluó la influencia de dicho factor sobre la expansión del cúmulo celular y sobre el desarrollo embrionario posterior, pero no sobre la maduración y la fecundación *in vitro* antes del comienzo del desarrollo embrionario.

d.- Condiciones del cultivo de maduración *in vitro*.

En lo que respecta a las condiciones ambientales del cultivo de los oocitos, se escogió la temperatura del cultivo de acuerdo con la temperatura corporal de la especie (39°C), una presión osmótica fisiológica de 295 ± 5 mOsm/L y un pH de 7,4 que se mantuvo en el medio con una concentración del 5% de CO₂ en el aire. Además de estos parámetros, se utilizó en la incubadora una humedad relativa cercana al 100%, de modo que todas estas condiciones tendieron a imitar las condiciones a las que está sometido el oocito *in vivo*.

El periodo de maduración fue, en nuestro trabajo, de 24 horas, ya que, en condiciones *in vivo*, es el tiempo que tarda el oocito en llegar al estadio de metafase II después del pico de la LH (Hyttel *et al.*, 1988). Esta duración del cultivo está de acuerdo con la que utilizan la mayoría de los autores consultados (Suss y Wuthrich, 1985; Xu *et al.*, 1986, 1987; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986; Lu *et al.*, 1987; Younis *et al.*, 1989; Gordon, 1990; Fukui, 1990; Rose y Bavister, 1992). Sin embargo, recientemente, Dominko y First (1992) han señalado que los mejores resultados de maduración, con vistas a la fecundación y al desarrollo embrionario *in vitro* hasta el estadio de blastocisto, se obtuvieron con periodos de maduración *in vitro* de 16 a 20 horas, lo cual deberá ser tenido en cuenta en futuros experimentos.

e.- Criterios de maduración *in vitro*.

Los criterios de maduración se basan en averiguar la configuración meiótica del oocito. Para ello es preciso que sean fijados y teñidos. La técnica de fijación y tinción empleada en este trabajo es la utilizada por la mayoría de los autores. Permite una visualización fácil y relativamente rápida de las estructuras nucleares, aunque presenta un inconveniente, que es, como señalan Trounson *et al.* (1978) y Xu *et al.* (1986), que en determinadas ocasiones, en un oocito maduro -metafase II- el colorante puede arrastrar y hacer desaparecer el primer corpúsculo polar, con lo cual, la configuración cromosómica presentaría el estadio de metafase I. Este hecho se da raramente y este método se muestra, con todo, como uno de los mejores sistemas para averiguar el estadio de maduración alcanzado. En nuestro trabajo, se introdujo una modificación del método de fijación y tinción habitualmente descrito, como fue la utilización de silicona líquida entre cubreobjetos y portaobjetos. De esta manera, ambos cristales quedan mejor fijados que con la mezcla de parafina-vaselina empleada en otros trabajos y, después de la tinción, los oocitos se pueden visualizar mejor.

El criterio de maduración nuclear comúnmente seguido por los autores es el de considerar, como oocito maduro, aquel que se encuentre en el estadio de metafase II. Algunos trabajos designan como oocitos madurados a aquellos en los que se produjo la desaparición de la vesícula germinal (GVBD), incluyendo los estadios de GVBD, metafase I, Anafase I y Telofase I, además de la metafase II (Dekel y Serizly., 1985; Feng *et al.*, 1988; Downs *et al.*, 1989; Downs, 1989; Armstrong *et al.*, 1991; Brucker *et al.*, 1991). Sin embargo, en este trabajo, se estableció el criterio de maduración de los oocitos en la consecución del estadio de metafase II, ya que es el estadio al que tiene que llegar el oocito antes de la fecundación en condiciones *in vivo* y, por lo tanto, el más apropiado para valorar, con la máxima certeza, el éxito de la progresión meiótica durante la maduración *in vitro*.

2.- EXPANSION DEL CUMULO CELULAR.

En condiciones *in vivo*, las células del cúmulo comienzan su expansión después del pico de las gonadotropinas, justo antes de la ovulación. En los oocitos bovinos, esta expansión comienza debido a la actuación de la FSH, que efectúa su acción mediante un mecanismo en el que está implicado el AMPc. La importancia dada a la expansión del cúmulo celular se debe a que estas células actúan como intermediarios de la acción ejercida por las gonadotropinas, hormonas esteroideas, factores de crecimiento y otros compuestos intrafoliculares que, mediados por mensajeros celulares (AMPc, calmodulina, Ca^{2+}), ejercen acciones sobre el oocito (Hytel, 1988; Gonçalves y Graves, 1992).

Uno de los resultados más evidentes de la expansión es la mucificación del cúmulo celular, debido a la secreción por parte de éste, de un glicosaminoglicano no sulfatado, el ácido hialurónico, que se dispone en la matriz intercelular y provoca la separación entre las células del cúmulo (Ball *et al.*, 1984). De esta manera, en el momento de la ovulación, las células del cúmulo se han expandido en compás con la progresión meiótica del oocito hasta la metafase II. La importancia de la expansión del cúmulo celular estriba en su importancia para favorecer la fecundación de los oocitos; la expansión completa del cúmulo influye, por un lado, en los mecanismos de capacitación, y por otro, permite efectuar una selección de los espermatozoides que llegan al oocito.

Algunos autores, señalan que esta similitud entre expansión del cúmulo y maduración del oocito, puede ser un indicador de la maduración del mismo. En nuestro trabajo, se ha medido la influencia que los sueros y factores de crecimiento, conjunta y separadamente, tienen sobre el grado de expansión del cúmulo celular, para después indicar la relación existente entre éste y la maduración del oocito.

Los autores que han estudiado este proceso han clasificado la expansión sufrida de varios tipos: Hensleigh y Hunter (1983) lo hacen en tres categorías de acuerdo al grado de expansión del cúmulo (1 a 3) comparado con la expansión de los oocitos madurados *in vivo* a los que dan un valor de 4. Behnke (1987) lo hace en tres categorías. Downs (1988) señala 5 tipos de expansión (de 0 a 5) de acuerdo

al tamaño del cúmulo. Musse (1990) clasifica la expansión del cúmulo en 4 categorías (de 0 a 3) de acuerdo a su grado de mucificación. En nuestro trabajo se clasificó la expansión del cúmulo celular de acuerdo a la relación entre éste y el tamaño del oocito, de modo que la expansión máxima (+ + +) fue aquella que presentó un diámetro de más de tres veces el del oocito, similar al criterio de Behnke (1987).

En el tratamiento control, sin ninguna suplementación de sueros ni factores de crecimiento, se obtuvieron valores del 23% de expansión máxima. Este resultado es similar al señalado por Hensleigh y Hunter (1983), con un 18% de expansión máxima en un medio de maduración sin ninguna suplementación de suero ni de hormonas. Sin embargo, estos datos (mostrados en la **Tabla 7**), en el medio control, fueron superiores a los obtenidos por Younis y Brackett (1992) con un 11% de expansión máxima cuando utilizaron M-199 sin suero. Es destacable que casi un 70% de los oocitos no presentaron prácticamente expansión del cúmulo, de acuerdo con los datos señalados por los autores anteriores. Este resultado es lógico ya que, el medio control, no tiene prácticamente ningún factor que permita la expansión del cúmulo, ni hormonas ni los factores nutritivos que van incluidos en el suero.

Cuando se utilizaron solamente sueros en el medio de maduración, el porcentaje de expansión máxima aumentó respecto del control; así, con el SFB fue de un 36,1% similar al 40,3% obtenido por Behnke (1987) utilizando el medio MEM. Este valor no fue muy distinto al del medio control, pero hay que tener en cuenta que con el SFB casi un 70% (69,6%) de los oocitos presentó alguno de los grados de expansión del cúmulo, mientras que, en el control, ese mismo porcentaje (69,2%) fue de oocitos que no tuvieron prácticamente expansión.

Cuando se añadió SVE al medio se obtuvo la máxima expansión del cúmulo celular, de acuerdo a lo descrito por Schellander *et al.* (1990). El valor de expansión máxima fue del 52,9%, valor análogo al 53% obtenido por Sanbuissho y Threlfall (1989) que utilizaron también un 10% de SVE en el medio de maduración. Otros autores, indican un porcentaje de expansión del 95% cuando usan este tipo de suero,

pero no señalan si ese valor es de expansión máxima o solamente de expansión del cúmulo (Schellander *et al.*, 1990); en este último supuesto, el valor alcanzado en nuestro trabajo, en dicho medio, fue del 86,3%.

Otros autores han evaluado el grado de expansión del cúmulo celular cuando sometieron los oocitos a un medio de maduración *in vitro* con suero y hormonas gonadotropas (FSH y LH). Olson *et al.* (1990) obtuvieron un 64% de expansión máxima, al utilizar SFB y FSH, mientras que Armstrong *et al.* (1991), también con FSH, consiguieron un 100%, pero no señalaron que grado de la misma alcanzó el cúmulo celular; sin embargo, Zuelke y Brackett (1990) demostraron que suplementado el medio con LH, la expansión producida fue mucho menor a la inducida por la FSH, pero el oocito no perdía su capacidad de madurar *in vitro*. Younis y Brackett (1992) indicaron que el medio de maduración suplementado con SFB + TSH permitió lograr un 64% de expansión máxima, con lo que mostraron que la TSH también tuvo un efecto positivo en la expansión del cúmulo de oocitos bovinos frente a los tratamientos sin esta hormona. En la especie porcina, Musse (1990) obtuvo los mayores índices de expansión del cúmulo celular cuando utilizó, en el medio de maduración, una suplementación de suero de cerda en estro (10%), FSH (5 $\mu\text{g/ml}$) y LH (1 $\mu\text{g/ml}$).

Este ligero aumento de los índices de expansión, cuando se utilizan hormonas, respecto a los conseguidos solamente con SFB, se debe a que la FSH y LH, en combinación, estimulan la expansión del cúmulo, aunque también se ha descrito una cierta variabilidad entre la respuesta individual del cúmulo y la dosis de gonadotropinas empleadas (Ball *et al.*, 1984; Musse, 1990); este mismo autor ha descrito que, estas gonadotropinas, no tienen la misma capacidad para estimular el cúmulo cuando se utilizaron de manera aislada, ya que, la FSH presentó porcentajes de expansión sensiblemente mayores que la LH.

En nuestro trabajo, la adición de factores de crecimiento a todos los tratamientos empleados para evaluar la expansión del cúmulo celular, aumentaron considerablemente la tasa de expansión máxima, tanto en los tratamientos sin suero,

como cuando el medio llevó SFB o SVE. Las diferencias, entre los dos factores de crecimiento utilizados, se evidenciaron más en el grupo de tratamientos que no incluyeron sueros. En ellos, el EGF presentó el valor más alto, 46,5% de expansión máxima, mientras que el IGF-1 mostró un valor sensiblemente inferior (28,7%), aunque provocó una expansión total (suma de los criterios +, ++ y +++) mayor que la del control. La adición conjunta de los dos factores de crecimiento mostró una expansión máxima inferior a la que produjo el EGF sólo (42,8% frente al 46,5%), pero el total de los oocitos con expansión del cúmulo sí que fue mayor.

La expansión del cúmulo celular provocada por el EGF en los oocitos bovinos madurados *in vitro*, no ha sido estudiada, hasta el momento, por ningún autor, pero Downs (1989) sí efectuó estudios en este sentido en oocitos de ratona. Este autor indica, de igual manera que ocurre en nuestro trabajo, que el EGF es el factor de crecimiento que provoca el mayor porcentaje de expansión del cúmulo celular (en su trabajo, cercano al 100%). Los resultados que este autor obtiene son mayores que los de nuestro estudio debido, probablemente, a que utiliza EGF de origen murino en oocitos de ratona, lo cual le otorga una especificidad de especie considerable; además, el mecanismo por el que se produce la expansión del cúmulo en los oocitos murinos está regulado, en su mayor parte, por las concentraciones y fluctuaciones del AMPc, mientras que en el cúmulo celular de los oocitos bovinos, además del AMPc, también intervienen otros mensajeros intracelulares como la calmodulina, diacilglicerol y calcio iónico (Gonçalves y Graves, 1992), sobre los que, probablemente, el EGF no actúe de igual manera que sobre el AMPc.

El valor de la expansión mostrado por la utilización de FC fue superior a los medios que sólo contenían suero; además, la adición de suero con factores de crecimiento aumentó, en todos los casos estudiados, los porcentajes de expansión máxima y, muy especialmente, cuando se utilizó SVE. En ambos casos -SFB y SVE- el IGF-1 fue el que peor comportamiento tuvo, cercano incluso, al valor del control con SVE (54,4% frente a 52,9% de expansión máxima, respectivamente). Herler *et al.* (1992) estudiaron la expansión del cúmulo provocada por el IGF-1 en un medio de maduración con 10% de SVE y sus resultados de expansión (48%) son algo

menores a los de nuestro trabajo, aunque creemos que ello puede ser debido a que utilizaron en sus medios de maduración 50 ng/ml de IGF-1, la mitad de la concentración que se utilizó en este trabajo.

Buccione *et al.* (1990) señalaron que la expansión del cúmulo requería la acción de un factor endocrino, la FSH, que comenzaba su actuación gracias a la actuación paracrina de un compuesto soluble que era secretado por el propio oocito y actuaba en el cúmulo. La actuación de los factores de crecimiento sobre el cúmulo pueden, quizá, explicarse dentro de este contexto; así, las acciones ejercidas por este compuesto desconocido pueden ser mediadas por los factores de crecimiento, de tal manera que, en ausencia de hormonas gonadotropas, como la FSH, estos FC provoquen la expansión por los mismos mecanismos. La leve acción de expansión del cúmulo ejercida por el IGF-1 podría explicarse porque este factor tiene receptores en el propio oocito (Balboni *et al.*, 1987), a diferencia del EGF que sólo los tiene en las células de la granulosa, y puede que, en el mecanismo de reconocimiento, la molécula de IGF-1 interfiera con el compuesto que estimula la expansión, secretado por el propio oocito.

Además de Downs (1989) en la ratona, otros autores (Zhang *et al.*, 1991) utilizaron un análogo del IGF-1, la insulina, en el medio de maduración *in vitro* de oocitos bovinos y evaluaron la expansión que produjo, evidenciando un leve efecto positivo respecto del medio control. Downs señaló que el efecto de la insulina era peor que el producido por el propio IGF-1, probablemente debido a que el IGF-1 presenta mayor afinidad por los mismos receptores de la membrana celular.

La tabla 9 y el Gráfico 1 de los resultados, muestran el porcentaje de los oocitos que tuvieron la máxima expansión del cúmulo celular y el porcentaje de maduración *in vitro* de estos oocitos. En ellos se puede observar la relación existente entre el grado de expansión máxima y el de maduración alcanzado; en todos los casos, los valores de maduración fueron mayores a los de expansión, de acuerdo con lo indicado por Behnke (1987). Especialmente evidente fue la relación mostrada en el caso de los tratamientos que incluyeron ambos factores de crecimiento, en los que

existió una relación estrecha con el índice de expansión. Curiosamente, estos tratamientos son además los que, dentro de su mismo grupo, presentaron los índices de expansión y maduración más altos.

En los tratamientos con IGF-1, sin suplementación de suero, es destacable, al igual que lo han hecho Herlerr *et al.* (1992), que la diferencia entre los valores de expansión y maduración no ofreció ninguna correlación, presentando valores muy distanciados entre sí; sin embargo, pese a los bajos valores de expansión respecto al resto de los tratamientos con factores de crecimiento, los porcentajes de maduración no mantuvieron las mismas diferencias, sino que fueron similares e incluso superiores (caso del tratamiento que además del IGF-1 incluyó SVE) a los de los otros factores de crecimiento. Este hecho nos pareció indicar que el efecto que el IGF-1 ejerce sobre la maduración está mediado, en parte, por las células del cúmulo, aunque no de la misma manera que en el caso del EGF. Por lo tanto, de igual manera que la indicada por Herlerr *et al.* (1992), la maduración nuclear provocada por el IGF-1 no se corresponde con la expansión del cúmulo.

Con los datos obtenidos en nuestro trabajo no se puede asegurar rotundamente que, mediante la evaluación de la expansión del cúmulo celular, se pueda averiguar el porcentaje de maduración *in vitro* alcanzado. Esto es especialmente cierto cuando se utiliza una sustancia como el IGF-1 para favorecer la maduración *in vitro* ya que, como se ha señalado, no actúa de igual manera en el núcleo del oocito que sobre las células del cúmulo que le rodea. Por otro lado, distintos autores, señalan que la expansión del cúmulo celular y la maduración del oocito son procesos independientes (Schoroeder y Eppig, 1983) o que van unidas (Buccione *et al.*, 1990). Lo que sí se ha indicado es que, si se inhibe la acción que provoca la FSH en el cúmulo celular, ni este se expande ni el oocito madura (Eppig, 1982), por lo que, probablemente, la acción del IGF-1 sobre el oocito es independiente de la acción que pueda ejercer en el cúmulo celular.

Sin embargo, se ha podido encontrar una relación, entre expansión del cúmulo-maduración nuclear, cuando se utilizaron otros factores de crecimiento,

especialmente la adición conjunta de ambos factores con sueros. El conjunto de nuestro experimento nos hace estar de acuerdo con los autores que indican que la expansión del cúmulo no es un parámetro absolutamente válido de la maduración *in vitro* del oocito, sobre todo al utilizar IGF-1, pero por otro lado, al emplear otros tratamientos sí se encontró cierta relación entre la expansión y la maduración. Por todo ello y en esas determinadas circunstancias, parece adecuado afirmar que, la valoración de la expansión del cúmulo celular, es un parámetro fiable y, sobre todo, permite que, sin destruir el oocito por medio de las técnicas de fijación y tinción, se pueda obtener una aproximación del comportamiento que han tenido tras el periodo de maduración *in vitro*.

Este hecho tiene especial importancia cuando los oocitos madurados *in vitro* están destinados a los sistemas de fecundación *in vitro* y, por lo tanto, no pueden destruirse para averiguar su estado de maduración; de hecho, uno de los factores que tienen en cuenta ciertos autores a la hora de elegir oocitos para FIV, después del periodo de maduración *in vitro*, es el grado de expansión del cúmulo celular (Ball *et al.*, 1983; Behnke, 1987; Sanbuissho y Threlfall, 1989; Farin, 1991; Pavlov *et al.*, 1992).

La realización de un mayor número de estudios relativos a la influencia y mecanismo de actuación de los factores de crecimiento sobre la expansión del cúmulo (sobre todo en la determinación de los mensajeros intracelulares - diacilglicerol, calmodulina, AMPc, etc.- implicados en estos mecanismos), serían de gran ayuda a la hora de establecer las verdaderas relaciones entre expansión del cúmulo y maduración del oocito para dilucidar si, en virtud del factor de crecimiento utilizado, son dos procesos distintos e independientes o por el contrario, están íntimamente relacionados entre si.

3.- MADURACION *IN VITRO*.

Los valores obtenidos en los experimentos de maduración *in vitro* se exponen en en las tablas 10, 11 y 12 para los tipos morfológicos de oocitos A, B y C, respectivamente.

Como ya se ha señalado en parte anteriormente, el objetivo de estos experimentos fue utilizar los factores de crecimiento (EGF e IGF-1) en los medios de maduración *in vitro* de oocitos bovinos, dada la escasez de literatura existente al respecto, para comprobar si, al igual que en otras especies animales, favorecían dicha maduración. Para valorar el efecto de los FC, bajo distintas condiciones de cultivo, se añadieron en el medio de maduración de la siguiente manera: sin suplementación sérica, con suero fetal bovino o con suero de vaca en estro; de esta manera, en el primer caso, se pudo observar el efecto producido por ellos mismos en la maduración *in vitro*, mientras que, en el segundo y tercer caso, se evaluó si su presencia en el medio de maduración junto a una suplementación sérica aumentaba o no los índices de maduración de los oocitos.

Además de todo lo expuesto anteriormente, se quiso establecer si los mecanismos y efectos de los FC que favorecen la maduración *in vitro* utilizan las células del cúmulo celular que rodea al oocito como mediadores de este efecto, de la misma manera que, como señala Armstrong *et al.* en 1991, parecen actuar las hormonas; esta cuestión se apreció al dividir los oocitos en tres tipos morfológicos de acuerdo al número de capas del cúmulo que presentan.

Los porcentajes expuestos en las tablas anteriormente mencionadas señalan los estadios que presentaron los oocitos después del periodo de maduración. En adelante, como ya se expuso al comienzo del capítulo de discusión, sólomente nos referiremos a oocitos maduros como aquellos que llegaron al estadio de metafase II (M-II), excepto cuando se citen trabajos que expresan la maduración de los oocitos como el porcentaje de los que superaron el estadio de vesícula germinal GVBD.

En los oocitos *del tipo A*, los datos de maduración *in vitro* obtenidos en los tratamientos controles (T-1, T-6 y T-11) fueron los siguientes:

En el control sin suero se obtuvo un porcentaje de maduración del 36,5%, superior a los valores obtenidos por Fukui *et al.* (1982): 32% con M-199, 22% en KRB-m y 17% en BMOC-3. Por otro lado, Sanbuissho *et al.* (1990) emplearon el medio Ham F-12 sin ningún suplemento sérico, obteniendo en estas condiciones un 34% de metafase II, valor ligeramente más bajo que el obtenido en nuestro trabajo. Estos valores tan bajos que ofrecen la mayoría de los autores, obedece a la falta de suplementación proteica y energética de los medios; y, aunque los oocitos son capaces de completar la maduración *in vitro*, el índice de oocitos que al término del cultivo presentaron algún signo de degeneración fue mucho más alto que con los tratamientos que llevan sueros. En nuestro caso, fue de un 16% mientras que Fukui *et al.* (1982) indicaron que hasta un 55% de los oocitos se clasificaron degenerados cuando faltó suero en el medio.

Los porcentajes de maduración y degeneración se modifican al añadir sueros al medio. La suplementación con componentes séricos (BSA, SFB y SVE) se han utilizado en prácticamente todos los sistemas de maduración *in vitro*; esto se debe a la necesidad metabólica que el oocito tiene para sintetizar sus propias proteínas lo que, sólo ocurre en el periodo de maduración siempre que las condiciones del cultivo sean adecuadas. Entre los distintos compuestos séricos utilizados, el BSA es el componente que peores resultados tuvo en los sistemas de maduración, ya que, como indicaron Leibfried-Rutledge *et al.* (1986), no puede soportar el gasto energético que supone la expansión del cúmulo celular como tampoco ofrece buenos resultados de penetración de espermatozoides. Por este motivo, el medio de maduración, debe, por un lado, asegurar las condiciones metabólicas y energéticas del oocito y por otro, favorecer su fecundación. Los sueros empleados en este trabajo fueron FCS y SVE, ya que uno de los objetivos del presente estudio era analizar aspectos de la fecundación *in vitro*.

En los sistemas de maduración *in vitro* de muchas especies animales se

utiliza, como fuente proteica, suero de origen sanguíneo, SFB o suero en estro homólogo de la especie, como en el ratón (Eppig, 1989) o en el cerdo (Musse, 1990; Coy, 1992).

En nuestro trabajo, el porcentaje de maduración con SFB exclusivamente fue del 41,7%, valor que se aproxima a los que, para este mismo tipo de oocito, obtuvieron Xu *et al.* (1986) y Younis y Brackett (1992), que fue del 48% y 46%, respectivamente. Susko-Parrish *et al.* (1991) señalaron un 59% de maduración en estas condiciones, aunque estos autores, evaluaron como oocitos maduros, no solamente aquellos que llegaron a la M-II sino también a estadios anteriores, como anafase I y telofase I.

Los datos obtenidos en el tratamiento con SVE (45,6%) fue más alto que el presentado con SFB y, sobre todo, con el control. Este valor fue más bajo que el 69,9% que presentaron Sanbuissho y Threlfall (1989) y el 59,2% de Younis *et al.* (1989). Probablemente, las diferencias que se pueden observar con los resultados de otros autores, pueden deberse al método de obtención y preparación del suero ya que, por ejemplo, Schellander *et al.* (1990) obtienen el suero de vacas sometidas a tratamientos de superovulación, lo cual, modifica las concentraciones hormonales del suero. Por otro lado, tampoco señalan la aptitud ni la dieta de los animales utilizados para obtener el suero, lo cual puede también, influir en las concentraciones hormonales de LH, progesterona y estradiol sobre todo (Folman *et al.*, 1983).

Las diferencias entre los dos tipos de suero se encuentran en las concentraciones hormonales que poseen, ya que, al ser el SVE recogido en las horas inmediatamente posteriores al inicio de los síntomas psicossomáticos del estro, según Kruip (1988), tienen diferencias en las concentraciones de LH, progesterona, estradiol y de prolactina (Younis *et al.*, 1989). La adición de estas hormonas han justificado, en otros experimentos, un aumento de la maduración (Zuelke *et al.*, 1989; Fukui, 1989) pero no así de prolactina (Younis y Brackett, 1992). Por otro lado, el SVE empleado por nosotros presentaba una mayor concentración de TSH que la del SFB, y de acuerdo con un trabajo reciente (Younis y Brackett, 1992), esta

hormona puede influir también en el aumento de los resultados de maduración cuando se utiliza SVE.

Un hecho a destacar es el descenso en el número de oocitos degenerados cuando se utilizó un tratamiento con suero, desde un 16% en el medio control (sin suero) hasta el 5,9% y 8,8% en los medios con SFB y SVE, respectivamente. El dato obtenido con el SFB (5,9%) es similar al 7,5% de Sato *et al.* (1990) pero contrasta con el 22% de oocitos con signos de degeneración que obtuvieron Younis y Brackett (1992) al utilizar SFB.

En los oocitos tipo B, el tratamiento sin suero produjo el 30,7% de maduración. Este valor fue superior al 22% obtenido, en el mismo tipo de oocito, por King *et al.* (1986) con el medio KRB-m. En los tratamientos con suero, al igual que en los oocitos del tipo A, los porcentajes de maduración aumentaron (41,9% y 50% con SFB y SVE, respectivamente) a la vez que disminuyeron los de degeneración (6,4% y 9,5%); por lo tanto, el efecto del suero, también fue favorable en este tipo de oocitos.

Los porcentajes de maduración en el tratamiento sin suero, de los oocitos del tipo C, fue del 34,3%, mayor que el obtenido por King *et al.* (1986) pero algo menor que el 38% señalado, con el medio Ham F-12, por Sanbuissho *et al.* (1990). Cuando se utilizó suero, no se produjeron unas diferencias tan evidentes, en los valores de maduración, como en los oocitos A y B; con SFB fue del 37,2% y con SVE el 38,9%. El primero de ellos fue similar al obtenido por Leibfried y First (1979) y superior al 29% logrado por Susko-Parrish *et al.* (1992) y el segundo, inferior al 55% obtenido por Kim y Park (1990) que utilizaron en el medio concentraciones del 15% y 20% de SVE. Sin embargo, aunque el efecto de la suplementación sérica no se demostró claramente en este tipo de oocitos, sí que influyó en lo que respecta al número de oocitos que presentaron signos de degeneración; de esta manera, se observa en la **Tabla 12** de los resultados que, de un 21% de oocitos clasificados como degenerados, se obtuvieron solamente el 7,3% y 10,1% cuando se empleó suero en el medio de maduración. Al igual que indicaron

Xu *et al.* en 1986, este hecho se deba, probablemente, a que las pocas células que existen en estos oocitos pueden trasladar ciertos componentes séricos al interior del oocito y, aunque no se aumenta el número de oocitos maduros, sí que permite un menor porcentaje de degeneración.

Influencia de las células del cúmulo.

Las Tablas 19, 20 y 21 muestran el efecto de las células del cúmulo en los porcentajes de maduración *in vitro*, dependiendo del tipo de oocito y del tratamiento empleado. En todas ellas lo que más resalta es la gran diferencia que existió entre los oocitos que tenían todo o parte del cúmulo celular y los oocitos desnudos. En concreto, los porcentajes de maduración fueron considerablemente mayores, excepto el tratamiento con 20 ng/ml de EGF sin suero, en los oocitos del tipo A frente a los del tipo C, especialmente, en los medios que llevaron los dos tipos de FC a la vez y 50 ng/ml de EGF. El comportamiento entre los oocitos del tipo B y C es similar al indicado anteriormente, aunque las diferencias no son tan acusadas ni se produjeron en todos los tratamientos.

La razón de este efecto puede ser, de acuerdo con lo señalado por varios autores (Downs *et al.*, 1988; Sirard *et al.*, 1992) que los compuestos que mantienen detenida la meiosis provienen del cúmulo celular y pasan al oocito gracias a las uniones existentes entre éste y las células que le rodean. Cuando llega una sustancia que interrumpe ese flujo de compuestos inhibidores hacia el oocito, esta comunicación cúmulo-oocito se corta y el oocito se encuentra libre para reanudar la meiosis. Por lo tanto, en los oocitos desnudos, al no existir cúmulo celular, no se pueden ejercer esas acciones, debiendo estar a merced de los estímulos transmitidos por receptores de la propia membrana del oocito (Downs *et al.*, 1988) o por las pocas células de granulosa que rodean al gameto y puedan ejercer pequeños efectos estimuladores sobre la maduración. Las acciones más específicas de los factores de crecimiento se discutirán en las páginas siguientes.

Acción de los factores de crecimiento en la IVM.

Hasta el momento, en la bibliografía consultada, existen pocos trabajos que traten sobre la influencia que los factores de crecimiento (FC) tienen sobre la maduración *in vitro* de oocitos preovulatorios y, la mayoría de ellos, se refieren a oocitos de animales de laboratorio (rata y ratón).

Todos los factores de crecimiento que se han utilizado en dichos trabajos tienen en común que actúan a dosis muy pequeñas (del orden de ng/ml), están implicados en *mecanismos fisiológicos diferentes* y que su *mecanismo de actuación* se produce gracias a receptores localizados en las membranas celulares. La posibilidad de que puedan actuar en la maduración de los gametos femeninos tiene su origen en las acciones que ejercen en el aparato genital femenino, ya que se han aislado en el líquido folicular de varias especies animales, células tecaes e intersticiales ováricas, además de existir receptores para ellos en las células de la granulosa. No todos los FC empleados, hasta la fecha, en la maduración *in vitro* de oocitos, han demostrado un efecto beneficioso sobre la misma (Downs, 1989).

En nuestro trabajo, se demuestra claramente que los FC de crecimiento empleados, EGF e IGF-1, separada y conjuntamente, estimulan, de manera significativa, la maduración *in vitro* de oocitos bovinos: este hecho se produjo en medios de maduración sin ninguna suplementación sérica y, también, en medios con suero en los que, además, se alcanzaron los mayores valores de maduración de los oocitos.

a.- Tratamientos sin suero (Grupo control). En el grupo de tratamientos en los que no se utilizó suero, *en los oocitos de tipo A*, con cúmulo celular completo (Tabla 10), el tratamiento con 20 ng/ml de EGF fue el que peor comportamiento tuvo y prácticamente no se diferenció del tratamiento control (40,4% y 36,5%, respectivamente). El tratamiento con 50 ng/ml de EGF sí tuvo, por el contrario diferencias significativas frente al control (53,3% frente a 36,5%). Este hecho coincide con un efecto dosis-respuesta para el EGF, que ya ha sido señalado por

varios autores, uno de ellos en la maduración de oocitos de ratona (Downs, 1989) y el otro, con oocitos bovinos (Sanbuissho *et al.*, 1990). En ambos casos, de igual manera que en nuestro trabajo, al utilizar dosis de EGF cercanas a los 50 ng/ml, se observó un mayor índice de maduración y de GVBD; este hecho sin embargo contrasta con la concentración utilizada por Sommer *et al.* (1992) en la maduración *in vitro* de oocitos porcinos, donde señala que 10 ng/ml e incluso menores, ejercen mejores acciones que dosis más altas. Estos mismos autores fundamentan su elección en que, a dicha concentración, se produce una mayor incorporación de aminoácidos al interior del oocito porcino; sin embargo, otros autores que también han trabajado en la misma especie, señalaron que la dosis más adecuada para conseguir la maduración *in vitro* fue de 50 ng/ml (Illera *et al.*, 1992).

Los porcentajes de maduración obtenidos con el EGF son similares a los que obtuvieron en oocitos bovinos, con la misma dosis aunque con un medio distinto (Ham F-12), otros autores. En concreto, Sanbuissho *et al.* (1990) obtuvieron un 85 % de GVBD frente al 85,2% de nuestro trabajo, mientras que Coskum *et al.* (1991) obtuvieron un valor de maduración más alto que en nuestro estudio (79%) también con un medio de cultivo distinto (DME/F-12). Los mayores porcentajes de maduración de oocitos en la bibliografía consultada corresponden a los ofrecidos por Deckel y Serizly (1985) y Downs (1989), ambos con valores del 100% de GVBD, en oocitos de rata y ratona, respectivamente. Este porcentaje tan alto pudo deberse a dos causas: la alta especificidad entre el EGF utilizado (estos autores escogieron EGF de origen murino) que, además de este valor de maduración, permitió un valor de expansión del cúmulo celular cercano también al 100%, y también pudo ser debido a que en el mecanismo de detención/activación meiótica del oocito de estas especies animales, el AMPc juega un papel esencial; esto no ocurre así en la especie bovina (Sirard 1992) donde, además del AMPc, otra serie de sustancias se comportan como inhibidores potentes de la reanudación meiótica (adenosina, hipoxantina) sobre las que, probablemente, el EGF no actúa de igual manera.

El mecanismo de actuación del EGF se basa en la inhibición de la formación de AMPc en las células de la granulosa (Deckel y Sherizly, 1985; Feng *et al.*,

1986); este compuesto pasa, a través de las uniones intercelulares, al oocito y lo mantiene en reposo meiótico. Cuando se interrumpen estas uniones, se corta el flujo de AMPc, activándose una señal que implica la entrada del oocito en meiosis. Este mecanismo de actuación se apoya en que, como señala Downs (1989), el EGF es el FC que produce una mayor expansión del cúmulo, de manera análoga a la FSH; de esta manera, al igual que indicó Pellicer *et al.* (1989), la actuación del EGF puede comenzar interrumpiendo la acción de esta hormona sobre el cúmulo celular, bien directamente o utilizando su mismo mecanismo de actuación, obteniendo como resultado una disminución en las concentraciones de AMPc. Además, el EGF también presenta ciertas acciones similares a las de la LH, tal y como afirman Deckel y Serizly (1985), una de cuyas acciones sobre la maduración del oocito, entre otras, consiste precisamente en interrumpir las comunicaciones entre el cúmulo celular y el oocito.

Todavía no se sabe ciertamente cual o cuales son las acciones específicas ejercidas por este factor de crecimiento sobre el oocito, aunque sí se conoce que después de la unión EGF-receptor se activa un sistema de señales intracelulares, sobre todo de la PKC (James y Bradshaw, 1984; Aberdam y Deckel, 1985) que, tras defosforilar una proteína de naturaleza aún desconocida, intervienen en la transmisión de señales que desencadenarán la activación meiótica. Profundizando más aún en estos mecanismos, Newport y Kichner (1984) señalaron que en concreto, el mecanismo de activación meiótico del EGF, y probablemente de otros FC, se basa en la defosforilización de un componente del factor promotor de la maduración (MPF) que, al activarse, induce el comienzo de la maduración del oocito.

En lo que respecta al IGF-1, Downs (1989) indicó que este factor de crecimiento produjo sólo una ligera estimulación de la maduración *in vitro* de oocitos de ratona. Sin embargo, en nuestro trabajo sí que provocó un estímulo significativo, respecto del grupo control (48,7% y 36,5%, respectivamente). A pesar de la falta de bibliografía existente en la especie bovina sobre el efecto del IGF-1, Herlerr *et al.* señalaron recientemente (1992) que, este factor de crecimiento, estimula la maduración y fecundación *in vitro* del oocito y su desarrollo embrionario

posterior, aunque en su trabajo ofrecen sólo datos sobre el desarrollo embrionario temprano. Estos mismos autores señalan que este factor de crecimiento puede actuar mediante las células de la granulosa o directamente en el oocito. En nuestro trabajo, de la misma manera que lo señalado por Downs (1989) en los oocitos de ratona, observamos un menor efecto en la maduración cuando se utilizó IGF-1 frente al EGF, pero el porcentaje de maduración que obtuvo este autor (66% de GVBD) fue menor que el conseguido en nuestro trabajo (79% de GVBD) con idénticas concentraciones de IGF-1. En la rata, Feng *et al.* (1988) lograron un 70% de GVBD, aunque utilizaron 50 ng/ml de IGF-1.

La acción por la que el IGF-1 actúa sobre la maduración del oocito no está todavía aclarada. Adashi *et al.* (1988) señaló que este factor de crecimiento, actuaba a nivel del cúmulo celular inhibiendo la actividad del AMPc e induciendo la creación de receptores para la LH, de manera parecida a la FSH; pero parece que el IGF-1 ejerce fundamentalmente su actividad directamente sobre el mismo oocito, interviniendo en la regulación de procesos de transcripción de ADN y de síntesis de proteínas citoplásmicas, que, por otro lado, todavía son desconocidas (Zumstein y Stiles, 1987). Recientemente, Hainant *et al.* (1991), han señalado que también el IGF-1 defosforiliza un componente proteico del MPF, lo que puede explicar su papel en la maduración.

El mecanismo de acción directa del IGF-1 sobre el oocito, explicaría que aunque el IGF-1 no produce una evidente expansión del cúmulo, sobre todo comparándola con el EGF, puede, sin embargo, inducir la maduración *in vitro* del oocito en varias especies animales, como se demuestra en este trabajo y en los de los autores anteriormente citados.

El uso conjunto de ambos factores de crecimiento (EGF + IGF-1) en el medio de maduración supuso alcanzar, dentro de este grupo de medios sin suero, el máximo porcentaje de maduración (60,3%), no existiendo en la bibliografía consultada, hasta el momento, ningún estudio que haga referencia al empleo conjunto de estos dos factores de crecimiento en sistemas de maduración y fecundación *in*

vitro de oocitos, salvo una comunicación personal de Illera (1992) en oocitos porcinos. En la bibliografía consultada, Feng *et al.* (1988), utilizaron conjuntamente IGF-1 y TGF β en el medio de maduración de oocitos de rata, obteniendo un leve efecto positivo. En el ovario los factores de crecimiento actúan de manera coordinada (Hill, 1989) para producir los correspondientes efectos biológicos y, por lo tanto, es lógico pensar que, la suma de dos factores de crecimiento de acciones no antagónicas, puede aumentar los valores de maduración y fecundación *in vitro*; de esta manera, el efecto ejercido por ambos factores podría explicarse por una suma de sus mecanismos de acción, a nivel de cúmulo celular (EGF) y directamente sobre el propio oocito (IGF-1). Recientemente, Angervo *et al.* (1992) indicaron que la presencia de EGF estimula la producción de una proteína relacionada con el IGF-1 por parte de las células de la granulosa. Este hecho, que es tiempo dependiente y tarda unas 24 horas en completarse, podría explicar también el efecto producido por ambos FC ya que, en nuestro trabajo y en lo comunicado por Illera (1992), el tiempo de maduración de los oocitos es de 24 y 42 horas, lo que da lugar a que se ejerza un efecto positivo por esta causa.

Por otro lado, nuestros resultados (Tabla 10) indicaron que 50 ng/ml de EGF provocó la maduración *in vitro* mejor que cuando se utiliza medio con sueros (SFB y SVE), que en nuestro estudio fue: con EGF 53,3%, con SFB 41,7% y con SVE 45,6%. Cuando se utilizaron ambos FC, los valores también superaron los datos anteriormente mencionados e incluso a los tratamientos que llevaron suero más algún factor de crecimiento (IGF-1+SFB y EGF 20+SVE, 48,7% y 53,3%, respectivamente).

Para los oocitos del tipo B no existe, en la literatura consultada, ningún ejemplo de maduración *in vitro* de oocitos bovinos, con el cúmulo celular que caracteriza a este tipo de oocito. Los resultados de maduración obtenidos con este tipo de oocito, son similares a los del tipo A, anteriormente mencionados; sin embargo, en este caso, los porcentajes de maduración de los tratamientos con EGF 50 y la adición conjunta de ambos factores, presentaron valores similares, a diferencia de los oocitos del tipo A, donde existió una clara diferencia entre ambos

tratamientos. Este hecho particular, podría explicarse porque la acción de los dos factores de crecimiento necesita de un cúmulo celular completo y, por esto, ya que la dosis de EGF empleada en ambos casos es idéntica, puede que el IGF-1 no pueda actuar o que exista algún tipo de bloqueo o competencia en los mecanismos de actuación de ambos factores. En cualquier caso, la utilización de 50 ng/ml de EGF, sólo o con IGF-1, superó los tratamientos controles con SFB y SVE, con lo que se demuestra que, en este tipo de oocitos, el tratamiento con EGF produce un porcentaje mayor de maduración *in vitro* que los medios que contienen solamente sueros.

En los oocitos del tipo C, los porcentajes de maduración no variaron cualesquiera que fueran los factores de crecimiento utilizados, ni siquiera frente al tratamiento control. El valor más alto se presentó con 50 ng/ml de EGF (45,5%) y el más bajo con el EGF 20 (40,6%). En nuestro trabajo, de acuerdo con lo expresado por Deckel y Serizly (1986) y Feng *et al.* (1988) en la rata, Downs (1989) en la ratona y Sanbuissho *et al.* (1990) en oocitos bovinos, los oocitos desnudos no tienen capacidad para estimular la maduración *in vitro* cuando se utilizó EGF en el medio. Los datos de GVBD señalados por Sanbuissho son similares a los obtenidos en el presente trabajo (58% frente a 63%, respectivamente) aunque los de maduración (35%) son ligeramente inferiores (45,5%). Este dato pudo deberse a que algunos de los oocitos del tipo C de nuestro trabajo tenían células del cúmulo, y por ello, puede que éste tuviese un pequeño efecto positivo.

La mayoría de los trabajos de los autores anteriormente citados, señalaron que, los factores de crecimiento, no ejercían ningún efecto sobre oocitos desnudos, de la misma manera que indican otros autores cuando emplearon medios de cultivo suplementados con hormonas (Leibfried y First, 1979; Xu *et al.*, 1986). Este hecho es debido a que, el efecto del EGF, se ejerce a través de un factor o factores proveniente del cúmulo celular que, estos tipos de oocitos desnudos, no tienen.

b.- Tratamientos con SFB.

En los oocitos del tipo A, todos los tratamientos que incluían FC tuvieron porcentajes de maduración significativamente más altos que el tratamiento control (sóamente con SFB), según se demuestra en la **Tabla 13**. El valor máximo de todo el trabajo se alcanzó al utilizar la adición conjunta de los FC (77,6% de maduración y 92% de GVBD) y sóloamente un 2,9% de los oocitos no tuvieron ningún estímulo y permanecieron en estadio de GV. Los dos tratamientos con EGF fueron superiores al que llevó IGF-1, que sóloamente superó al tratamiento control.

Estos datos demuestran claramente que el SFB junto con los factores de crecimiento aumentan significativamente los índices de maduración *in vitro* respecto al grupo de tratamientos sin suero, como se indica en la **Tabla 16**. En todos los tratamientos, los valores fueron más altos cuando se incluyó SFB en el medio de maduración.

También los tratamientos con SFB en *los oocitos tipo B* fueron significativamente mayores a los del grupo sin suero, aunque se observó que, el tratamiento con IGF-1, presentó el valor más alto de maduración dentro de este grupo. Este aumento del porcentaje de maduración, sóloamente se da en los oocitos B y C, y puede deberse a que el IGF-1 actúe con un determinado compuesto del SFB sóloamente en oocitos con pocas o ninguna capa celular, ya que, con otro suero o con oocitos con un cúmulo celular completo, este hecho no ocurre.

Las difencias entre los medios del grupo con SFB y los mismos medios pero del grupo sin sueros, están reflejadas en la **Tabla 17**, en ella se demuestra que todos los tratamientos tuvieron valores mayores cuando se utilizó SFB, aunque sóloamente significativos en el tratamiento con la adición conjunta de ambos factores de crecimiento.

En los oocitos del tipo C sóloamente el tratamiento con IGF-1 y con ambos FC a la vez fueron ligeramente superiores a los demás, aunque los valores

estuvieron muy próximos entre si (45%-40,7%). Este ligero aumento pudo ocasionarse debido a las células del cúmulo que algunos oocitos presentaban, que pudieron inducir algún estímulo positivo. Un comportamiento similar a este, aunque utilizando un medio con hCG y estradiol, fue descrito por Xu *et al.* (1986). Los valores de maduración en este tipo de oocitos, no presentaron diferencias cuando se compararon los tratamientos del grupo sin suero y los del grupo con SFB.

c.- Tratamiento con SVE.

Los porcentajes de maduración más elevados se alcanzaron, *en los oocitos del tipo A*, en los medios que llevaron la adición conjunta de ambos FC y también en los que incluían EGF 50 (Tabla 13). Todos los tratamientos que incluyeron factores de crecimiento fueron muy significativos respecto al medio que tenía sólo SVE. La diferencia con el grupo de medios sin suero fue muy significativa pero no con el grupo del SFB donde, incluso, se presentaron porcentajes mayores. Este dato, ya que estos sueros se diferencian en las concentraciones de estradiol, progesterona, LH, TSH y PRL, (Younis *et al.*, 1989; Younis y Brackett, 1992), permite afirmar que, la existencia de ciertas cantidades de estas hormonas en el suero en estro, pueden saturar los receptores celulares para los FC, hecho ya apuntado por otros autores que, cuando utilizaron concentraciones de LH y TSH superiores a las que produjeron los mejores efectos de maduración y fecundación *in vitro*, se observó una menor respuesta por parte del oocito (Younis y Brackett, 1992).

De otra parte, los datos obtenidos en nuestro trabajo mostraron que el IGF-1 presentó un mejor porcentaje de maduración en el tratamiento con SVE que con el SFB; en este sentido Ganong (1991), señala que existen relaciones entre las acciones de la TSH y el IGF-1; por otro lado, el SVE empleado en nuestro trabajo, tiene mayor cantidad de TSH que el suero fetal (2,8 μ U/ml frente a 1,3 μ U/ml, respectivamente), por lo tanto, estos datos, pueden justificar el aumento del porcentaje de maduración producido por el IGF-1 + SVE que cuando se utiliza IGF-1 + SFB. Además, uno de los efectos que produce el IGF-1 en las células de

granulosa es aumentar el número de receptores para la LH, como han señalado también Herlerr *et al.* (1992). Por esta razón, al utilizar SVE, que tiene mayor concentración de LH que el SFB, tal y como indicaron Younis *et al.* (1989), se produjo un aumento en los valores de maduración *in vitro*. Estos resultados del IGF-1 se observaron solamente en los oocitos con capas completas de cúmulo celular (A y B), pero no en los desnudos (C) ya que, la acción en la maduración del oocito producida por la LH, necesita del cúmulo celular para efectuarse, tal y como han señalado autores que solamente emplearon LH en sus medios de maduración (Brackett *et al.*, 1991).

En los oocitos del tipo B los mejores valores de maduración se lograron con la adición a la vez de ambos factores de crecimiento (71,5%), que fueron más altos que el resto de los tratamientos, de manera análoga a lo que sucedió en los oocitos del tipo A; sin embargo, y de la misma manera que ocurría en el grupo de tratamientos con SFB, el siguiente tratamiento en producir mejor resultado de maduración *in vitro* es el que llevó IGF-1, debido, probablemente, a las mismas razones explicadas anteriormente. El grupo de medios con SVE mostró mayores porcentajes de maduración, respecto del grupo con SFB, en los tratamientos sin factores de crecimiento, IGF-1 y con los dos FC conjuntamente.

En cuanto a los oocitos del tipo C, sorprendentemente, el tratamiento con 20 ng/ml de EGF fue mejor que con 50 ng/ml. El valor más alto se obtuvo con los dos factores a la vez y fue el único significativo con el resto de los tratamientos excepto con el que incorporó IGF-1. La diferencia entre los sueros empleados con los oocitos del tipo C y los FC fue mínima y todos los valores oscilaron entre unos porcentajes no significativos entre si; además, como muestra la **Tabla 18**, no existió diferencia ni entre los sueros entre si ni de ninguno frente al control, a excepción del tratamiento con ambos FC + SVE frente al mismo tratamiento sin suero. Todo ello, demuestra la mínima respuesta que este tipo de oocitos, sin cúmulo celular, tiene a los factores de crecimiento y los sueros.

De acuerdo con Downs *et al.* (1988) las hormonas, sobre todo la LH y FSH, actúan sobre el oocito mediante mecanismos parecidos y mediados por el cúmulo celular. Este mismo autor señala que, el AMPc, uno de los inhibidores más potentes de la reanudación meiótica, está generado por las células del cúmulo, no por el oocito; además demostró que, después de administrar hormonas, los oocitos maduraron y en el cúmulo celular se produjo un aumento de las concentraciones de AMPc, con lo que cuando se interrumpe el paso de AMPc al oocito, debido a la acción de hormonas presentes en el medio de maduración, este puede madurar. Por ello, autores que han utilizado oocitos bovinos sin cúmulo celular en medios de cultivo con hormonas y sueros (Leibfried y First, 1979; Xu *et al.*, 1986) han demostrado que, este tipo de oocitos, tienen muy comprometida su capacidad para reanudar la meiosis, siendo sus resultados de maduración, menores que los mostrados por oocitos con el cúmulo completo.

En cuanto a los FC, Deckel y Serizly (1986) señalaron que la actuación de ciertos FC sobre la maduración del oocito estaba también mediada por las células del cúmulo, efectuando asimismo su acción, al interrumpir el trasvase de inhibidores de la maduración al interior del oocito. Los datos de nuestro trabajo están de acuerdo con los ofrecidos por Feng *et al.* (1988) en oocitos de rata y Downs (1989) en ratona, que demostraron que el EGF no podía provocar la maduración (GVBD) en oocitos desnudos ya que, de acuerdo con estos autores, la señal ejercida por el EGF se transmitía al oocito mediante las células del cúmulo. De igual manera Sanbuissho *et al.* (1990) señalan el mismo efecto en oocitos bovinos y sostienen una teoría similar a la de los autores anteriores. Por ello, nuestro trabajo confirma plenamente lo señalado por estos autores estableciendo que, en los oocitos desnudos, los FC no pueden ejercer las acciones que, en los oocitos que tienen cúmulo celular, producen un estímulo de la maduración *in vitro* respecto a medios de maduración sin FC. Esta aseveración es especialmente importante en el caso del EGF ya que, de acuerdo con los datos de nuestro estudio, la acción del EGF sobre la maduración de los oocitos, en contra de una de las hipótesis expresadas por Deckel y Serizly (1986), se efectúa solamente a través de aquellos oocitos con cúmulo celular.

Hasta el momento, la mayoría de los estudios sobre la maduración *in vitro* de oocitos bovinos se efectuaban suplementando los medios de cultivo con sueros (SFB y SVE) y con hormonas, esencialmente LH, FSH y estradiol 17 β (Ball *et al.*, 1983; Hensleigh y Hunter, 1985; Younis *et al.*, 1989). Estos autores evaluaron el efecto de esta suplementación hormonal en la maduración nuclear (Fukui *et al.*, 1982, Xu *et al.*, 1986) y en la fecundación *in vitro* (Funakashi y Fukui, 1985; Hensleigh y Hunter, 1985; Younis *et al.*, 1989).

La adición de gonadotropinas (FSH o LH) junto con estradiol aumenta los índices de maduración (Fukui *et al.*, 1982; Younis *et al.*, 1989) pero la suplementación exclusiva con estradiol no sólo no produce el mismo efecto sino que, incluso, puede provocar alteraciones cromosómicas (Kruip *et al.*, 1983). Por su parte, la adición de FSH sólo produce una alta tasa de expansión del cúmulo celular y de penetración de los espermatozoides en la fecundación (Ball *et al.*, 1984; Hensleigh y Hunter, 1985). En general, según todos estos autores, la suplementación de los medios con hormonas ha producido un aumento en las tasas de maduración y fecundación *in vitro* (Younis *et al.*, 1989).

Los datos obtenidos en nuestro trabajo de maduración *in vitro* de oocitos bovinos son comparables a los que obtuvieron autores que utilizaron hormonas (FSH, LH y estradiol 17 β) en sus medios de maduración. En concreto, la suma de ambos FC junto con suplementación sérica, ofreció porcentajes de maduración de oocitos bovinos semejantes a los obtenidos por otros autores (Lenz *et al.*, 1983; Xu *et al.*, 1986; Fukui y Ono, 1989; Armstrong *et al.*, 1991; Susko-Parrish *et al.*, 1990; Dominko y First, 1992) y también análogos a otros trabajos en los que se utilizó, además de suplementación sérica y hormonal, cocultivo con células de granulosa (Critser *et al.*, 1986; Fukui y Ono, 1989).

Esta cierta similitud entre los efectos producidos por los factores de crecimiento y las hormonas sobre la maduración puede deberse a que, como señalaron Downs *et al.* (1988), ciertos mecanismos de actuación celular son análogos, sobre todo los relativos al papel jugado por el AMPc; por ello, parece

claro que, estos dos tipos de reguladores ováricos, que *in vivo* probablemente ejercen funciones sinérgicas (Hill et al., 1989), utilicen parecidos mecanismos de actuación celular, aunque la utilización de los FC suponga una mayor especificidad de la acción sobre el cúmulo celular (EGF) y sobre el citoplasma (IGF-1) del oocito que la acción hormonal.

Por todo lo expuesto, se puede decir que el papel que los factores de crecimiento juegan, principalmente, en la maduración *in vivo* del oocito bovino, puede trasladarse a los sistemas de maduración *in vitro*, presentando resultados en los porcentajes de maduración análogos que cuando se utilizan, para el mismo fin, hormonas o cocultivos con células granulosas.

4.- PRUEBAS DE FECUNDACION *IN VITRO*

Una vez conseguida la maduración *in vitro* de los oocitos en medios de maduración suplementados con factores de crecimiento, una de las formas más eficaces, para demostrar si dicha maduración se produjo correctamente, fue comprobar la capacidad de estos oocitos para ser fecundados *in vitro*; además, también se mantuvo la clasificación morfológica de los oocitos en tres tipos, para estudiar el efecto de las células del cúmulo en la fecundación de los oocitos madurados *in vitro* con factores de crecimiento y sueros.

Como medios de maduración se eligieron los dos tratamientos de maduración *in vitro* que dieron los mejores resultados, con gran diferencia sobre los demás; estos fueron los que incorporaron la adición conjunta de ambos factores de crecimiento (IGF-1 + EGF) junto con sueros (SFB o SVE). Como control, se utilizó un medio de maduración sin sueros ni factores de crecimiento.

a.- Metodología.

En base a la imposibilidad práctica de utilizar espermatozoides procedentes de eyaculado fresco, se utilizó semen congelado. La técnica de lavado e inducción a la capacitación que empleamos en este trabajo está basada en el protocolo descrito inicialmente por Parrish *et al.* (1986) y que es utilizado en muchos laboratorios del mundo de una manera casi rutinaria (Fayrer-Hoskens y Candle, 1990).

En nuestro trabajo, consideramos varios puntos claves de esta técnica, como: a) el mantenimiento de una temperatura lo más constante posible desde el mismo momento de la descongelación de los espermatozoides y b) la elección de la dosis de heparina sódica para inducir la capacitación (First y Parrish, 1987; First y Parrish, 1988; Farin, 1991). En cuanto al primer punto, se intentó mantener la temperatura, con las mínimas oscilaciones posibles, desde la descongelación de las pajuelas hasta la introducción de los espermatozoides en el incubador de CO₂. Algunos autores inducen la capacitación de los espermatozoides en baños térmicos (Yoshida *et al.*, 1992), lo cual no nos parece el sistema más adecuado, ya que First y Parrish (1988) señalaron que oscilaciones de tan sólo medio grado centígrado, en el periodo de incubación de los espermatozoides, podían alterar su capacitación, por ello, en nuestro trabajo, nos pareció mucho mejor asegurar la temperatura introduciendo los espermatozoides en la incubadora de CO₂. En cuanto al segundo punto, Parrish *et al.* (1986) utilizaron una concentración de heparina de 10 µg/ml para inducir la capacitación. Esta dosis ha sido objeto de muchas revisiones posteriores. En nuestro estudio empleamos 100 µg/ml de dicho compuesto, que es el mejor resultado obtenido, en pruebas previas, y que está de acuerdo con lo descrito por Lu *et al.* (1987 y 1988). A este respecto, Chian *et al.* (1992), señalaron recientemente que la dosis de heparina más efectiva para los sistemas de FIV bovina fue de 100 µg/ml, sobre todo, a la hora de evaluar el porcentaje de fecundaciones normales. Prácticamente, la mayoría de los autores utilizan la heparina sódica como inductor de la capacitación de los espermatozoides bovinos *in vitro*. Esta técnica, además, ha demostrado ser altamente repetible (Parrish *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1986; First y Parrish, 1987; First y Parrish, 1988; Lu *et al.*, 1988; Leibfried-

Rutledge *et al.*, 1989; Fukui, 1989; Fukui, 1990).

En nuestro trabajo se han utilizado pajuelas de semen provenientes de un sólo semental. Los autores de los trabajos consultados utilizan uno o más toros en sus experimentos. Aunque en un principio (Parrish *et al.*, 1986; Lambert *et al.*, 1986) emplearon dosis seminales de dos toros (estos autores describieron un aparente aumento de la penetración) poco a poco, la mayoría de los autores han ido empleando eyaculados provenientes de un sólo semental, eso sí, de reconocida capacidad reproductora. Por otro lado, Eyestone y First (1989) señalaron que las verdaderas diferencias entre los distintos toros utilizados para la FIV se demostraban, tras la fecundación, sólo en su capacidad para conseguir el desarrollo de estadios embrionarios posteriores al de 4 células; estas diferencias son debidas, probablemente, a la influencia del macho en el periodo de transición del genoma materno al embrionario, tal y como señalan Telford *et al.* (1990) y Shi *et al.* (1992).

Uno de los pasos de la metodología empleada contempla el lavado de los espermatozoides para eliminar componentes del diluyente. Este paso es fundamental, y en nuestro estudio se intentó hacer con mucho cuidado, incrementando en algunos minutos el tiempo de permanencia de los espermatozoides en la centrifugadora descrito en otros trabajos (Sanbuissho y Threlfall, 1989). Este hecho ha sido señalado recientemente por Olson *et al.* (1992) que indicaron que la eliminación de los restos del diluyente es fundamental para evitar fragmentaciones de los oocitos. En estudios previos se obtuvieron porcentajes menores del 3% de fragmentación después de la técnica de FIV, coincidiendo con los datos señalados por otros autores (Ball *et al.*, 1983; Lu y Gordon, 1988; Coskum *et al.*, 1991). La fecundación se realizó en placas Petri de 35 mm de diámetro, porque no se necesitaron tantos tratamientos distintos como en la maduración *in vitro* y son más manejables que las de 90 mm utilizadas en el capítulo anterior. El medio se dispuso en forma de microgotas bajo aceite de silicona, ya que, al igual que en los experimentos de maduración, también se tuvo en cuenta la independencia morfológica de los distintos tipos de oocitos.

b.- Criterios de fecundación *in vitro*.

La mayoría de los autores utilizan los criterios expuestos anteriormente en el capítulo de RESULTADOS. Respecto al valor de penetración, la mayoría de los autores está de acuerdo en otorgar esta clasificación a los oocitos que presenten uno o varios espermatozoides en su interior, sea cual sea su estado de decondensación, poliespérmicos a los que presenten más de un espermatozoide y fecundación normal a aquellos con dos pronúcleos, dos corpúsculos polares y, a veces, restos de la cola del espermatozoide (Fukui, 1989; Fukui, 1990; Schellander *et al.*, 1990; Pavlov *et al.*, 1992).

En otros trabajos el índice de fecundación se ha basado en la visualización de la primera división embrionaria, pero después de 24 horas de la fecundación (Sanbuissho y Threlfall, 1989). Las únicas discrepancias que existen con otros autores es a la hora de calcular el porcentaje de penetración o de fecundación. Es lógico pensar que, si sólo los oocitos maduros son capaces de ser penetrados por los espermatozoides, las cifras de fecundación se expresen como cociente de estos oocitos maduros. Sin embargo, hay autores que indican esos valores referentes al número de oocitos penetrados, con lo que los porcentajes que obtienen son más altos (Pavlov *et al.*, 1992).

En las Tablas 22, 23 y 24 se expresan los porcentajes de penetración, fecundación y poliespermia alcanzados después de la fecundación *in vitro*, en los oocitos de los tipos A, B y C. Los resultados se discuten seguidamente de acuerdo a estos resultados, aunque los datos obtenidos en los trabajos consultados y los distintos métodos y medios de cultivo empleados en ellos, hacen muy difícil comparar los resultados.

a.- Penetración de los oocitos. El porcentaje de penetración más alto obtenido en el experimento correspondió a los oocitos del tipo A, en el tratamiento con SFB + factores de crecimiento, aunque, con el SVE, se alcanzó un valor de

penetración similar (69,3%). Este tipo de oocito es el que normalmente emplean la mayoría de autores en sus medios de fecundación y desarrollo *in vitro*. Hay que hacer notar desde un principio que, en la bibliografía consultada, no existió ningún trabajo con resultados sobre la fecundación *in vitro* de oocitos bovinos madurados *in vitro* en presencia de factores de crecimiento y sueros, por lo tanto, los resultados obtenidos se compararán con los que otros autores han obtenido con otros sistemas de maduración y fecundación.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son superiores a los que obtuvieron otros autores (Ball *et al.*, 1983; Iritani *et al.*, 1984; Susko-Parrish *et al.*, 1990). En el caso del trabajo de Iritani *et al.* puede deberse a que emplearon un medio de maduración (KRB-m) y una técnica de capacitación (KRB-m y cafeína) distinta. El caso de Susko-Parish *et al.* tiene especial relevancia, ya que sus resultados se obtuvieron con un método de capacitación similar al empleado en este trabajo pero, además de la heparina sódica, utilizaron sustancias que favorecen la fecundación (penicilamina, hipotaurina y epinefrina). Otros autores presentaron mayores valores de penetración que los de nuestro estudio. Entre ellos, los de Younis *et al.* (1989) que sólo emplearon SVE en el medio de maduración y el de Pavlov *et al.* (1992), aunque en este caso obtuvieron los oocitos mediante disección y, la maduración, se realizó suplementando el medio con SVE y hormonas (LH, FSH y estradiol). Leibfried-Rutledge *et al.* (1986) realizaron experimentos donde se comparaba la fecundación *in vitro* de oocitos madurados *in vivo* e *in vitro*. Los resultados de fecundación obtenidos por estos autores en oocitos madurados *in vivo* son superiores a los de nuestro trabajo (86% frente a 70,4%) pero los resultados de los oocitos madurados *in vitro* son similares. Otros autores que han empleado suero, hormonas e incluso cocultivos con células de granulosa en el medio de maduración han obtenido porcentajes de penetración similares que los de nuestro trabajo (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986; Saeki *et al.*, 1990; Berg y Brem, 1990), de esta manera, en este trabajo se demuestra que, la suplementación durante la maduración *in vitro* de los oocitos bovinos, con factores de crecimiento y sueros, otorga al oocito de las mismas o incluso mejores condiciones para la penetración de los espermatozoides que cuando se emplean hormonas y/o cocultivos de células de

la granulosa.

Los oocitos del tipo B presentaron valores de penetración más bajos que los del tipo A, existiendo diferencias más acusadas entre los oocitos que maduraron con SFB+FC (59,5%) y los que lo hicieron con SVE+FC (50,5%). Hay pocos trabajos que evalúen la maduración y fecundación *in vitro* en este tipo de oocito, con pocas capas del cúmulo celular desde el comienzo del cultivo de maduración; la mayoría de los autores que valoraron la penetración espermática en este tipo de oocitos, lo hicieron quitándole parte del cúmulo, pero después del periodo de maduración, con lo que el oocito maduró realmente con el cúmulo completo. Shioya *et al.* (1988) señalaron, en estos oocitos, un porcentaje de penetración muy elevado (85,8%), similar incluso a los obtenidos con oocitos con cúmulo completo. Kim y Park (1992) obtuvieron también valores más elevados (74%) que los alcanzados en nuestro trabajo.

Los valores de penetración en los *oocitos del tipo C* fueron mucho más bajos que los de los oocitos con cúmulo. El mayor porcentaje (32%) se presentó en los oocitos madurados con SFB+FC. Los autores que fecundaron *in vitro* oocitos de este tipo obtienen, en todos los casos consultados, porcentajes más altos que los obtenidos en este trabajo: Ball *et al.* (1983), 57%; Younis y Brackett (1992), 50% y Kim y Park (1990), 48%; aunque estos autores también quitaron las capas del cúmulo de los oocitos después de la maduración *in vitro*, con lo que no evaluaron correctamente la capacidad del propio oocito desnudado y, de esta manera, los porcentajes de fecundación son más altos debido a que las cifras de maduración de estos oocitos son considerablemente mayores que cuando se cultivan desde un principio ya desnudados, como en nuestro trabajo.

b.- Fecundación de los oocitos. En cuanto al porcentaje de *oocitos del tipo A* que presentaron fecundación normal, los resultados de nuestro estudio (55,8%) fueron superiores a los que se obtuvieron en algunos trabajos, donde se utilizaron hormonas y suero en el periodo de maduración (Fukui *et al.*, 1983; Fukushima y Fukui, 1985; Pavlov *et al.*, 1992) o incluso mayor que en oocitos madurados *in vivo*

(Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986). Otros autores que utilizaron también sueros, hormonas y cocultivos de granulosa (Lutterbach *et al.*, 1987; Fukui y Ono, 1989) o sueros y hormonas (Stubbings *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1990) presentaron porcentajes similares, mientras que, Coskum *et al.* (1991) obtuvieron un índice de fecundación del 58% utilizando en el medio de maduración 50 ng/ml de EGF. Otros autores, sin embargo, utilizando hormonas y sueros para la maduración y la misma técnica de capacitación que nuestro trabajo, obtuvieron unas mayores cifras de fecundaciones normales (Lu *et al.*, 1987; Lu y Gordon, 1988; Schellander *et al.*, 1990; Fukui, 1990) aunque la mayoría de ellos, salvo excepciones, obtuvieron porcentajes que no sobrepasaron el 65%, lo cual hace que la diferencia con nuestros resultados no sea considerable.

En los oocitos del tipo B, Fukui (1990) obtuvo solamente un 39% de fecundación normal, dato que nos parece excesivamente bajo, ya que, los oocitos denudados que el utilizó, provenían de oocitos madurados con cúmulo completo y denudados después del periodo de maduración *in vitro*.

Los distintos trabajos consultados arrojan similares cifras de fecundación *en los oocitos del tipo C*, que el 35% obtenido por Ball *et al.* (1983) y el 30% por Fukui (1990). Estos porcentajes son mayores que los obtenidos en nuestro trabajo (18,9% con SFB+FC) aunque la causa, como se ha mencionado anteriormente, pudo ser que estos autores denudan los oocitos después de la maduración de éstos y no antes.

c.- Poliespermia de los oocitos. Tanto en los *oocitos del tipo A como en los del tipo B*, los porcentajes de poliespermia fueron mayores en los tratamientos con suero fetal que los que llevaron suero en estro, con diferencias que casi doblaban el valor de las cifras obtenidas con este último (27,1% frente a 13,7% y 28,6 frente a 15,8, para los oocitos A y B, respectivamente). Estos valores son menores que los que obtuvieron Pavlov *et al.* (1992) y similares a los presentados por Coskum *et al.* (1991) al utilizar EGF en el medio de maduración. Otros autores han señalado el porcentaje de polispermia en valores cercanos al 15% (Ball *et al.*, 1983; First y

Parrish, 1987) mientras que Iritani *et al.* (1984) mostraron una cifra de poliespermia del 0%. Este dato es, a nuestro entender, demasiado bajo, ya que, aunque la especie bovina no alcanza valores de poliespermia tan elevados como en otros oocitos como los porcinos, la mayoría de los autores, incluso en trabajos muy recientes, señalan normal la obtención de porcentajes de poliespermia cercanos al 15-20% (Fukui y Ono, 1989; Coskum *et al.*, 1991; Pavlov *et al.*, 1992). Quizás este hecho se deba a que, aquellos autores, utilizaron KRB-m como medio de maduración suplementado sin sueros, sino solamente con BSA. Shioya *et al.* (1988) utilizando un medio de capacitación con cafeína, suero fetal y hormonas obtuvieron un índice de poliespermia del 14,3% en oocitos del tipo C, análogo al 15,8% obtenido en nuestro trabajo con SVE+FC. Sin embargo, estos mismos autores describen que con oocitos desnudos tuvieron un 0% de poliespermia, que nos parece excesivamente bajo, ya que en los oocitos desnudos empleados en nuestro trabajo, al igual que lo que señala Fukui (1990), presentaron porcentajes de poliespermia.

El origen de la poliespermia es una anormal distribución y liberación del contenido de los gránulos corticales en el momento de la fecundación del oocito (Hyttel, 1988). Esto se debe a que, habitualmente, la distribución de estos orgánulos durante la maduración *in vitro* está retardada respecto de la maduración *in vivo* o que, como han señalado otros autores, la poliespermia y el mecanismo de liberación del contenido de los GC es un fenómeno dependiente de la relación Ca^{2+}/Mg^{2+} en la especie porcina (Cran y Cheng, 1986) o calcio-dependiente en los bovinos; en esta especie, en las horas correspondientes a la fecundación, se han encontrado en el oviducto bovino concentraciones de Ca^{2+} superiores a 3 mM, mientras que, el medio de fecundación, solamente tiene 2 mM (Hyttel *et al.*, 1988). Otros autores (Chian *et al.*, 1992) han señalado que la duración del tiempo de maduración es muy importante ya que, las cifras de poliespermia aumentaron desde un 24% cuando el periodo de maduración era de 24 h. mientras que si se prolongaba hasta 36 h. se obtenía el 45% de poliespermia.

Recientemente, en la fecundación *in vitro* de oocitos de la especie porcina - con problemas de poliespermia mucho mayores que la bovina- Yoshida *et al.* (1992)

señalaron que la suplementación del medio con glutatión reduce la polispermia debido a que, este compuesto, interviene en la maduración citoplásmica y asegura una mayor eficacia en la liberación del contenido de los gránulos corticales (GC) y bloqueando el paso de los espermatozoides.

c.- Influencia de los sueros.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la fecundación *in vitro*, en general, excepto en los oocitos del tipo C, existieron diferencias importantes a la hora de utilizar uno u otro suero en los sistemas de maduración *in vitro*. En concreto (según se expone en la **Tabla 25** del capítulo de RESULTADOS) los oocitos con cúmulo, A y B, tuvieron unos porcentajes de penetración superiores cuando se empleó en el medio de maduración SFB+FC; este hecho se debió, tal y como se observa en las **Tablas 22, 23 y 24**, a que estos oocitos mostraron unas cifras significativamente mayores, casi el doble, de poliespermia cuando se utilizó dicho tratamiento (SFB+FC) respecto al que llevaba SVE+FC. Este hecho, está de acuerdo con lo que señalaron Fukui y Ono (1989), cuyos experimentos incluso demostraron unas diferencias aún mayores a la hora de utilizar uno u otro tipo de suero; estos autores, atribuyen estas diferencias a causas no aclaradas aún o a una posible variación de la composición de los lotes comerciales del SFB utilizado que pueden interferir en los mecanismos de penetración del espermatozoide (Shiigi y Mischel, 1975).

En nuestro estudio, por lo tanto, eliminando las cifras de poliespermia, el tratamiento con SVE+FC resultó ser el que mejores resultados mostró, de acuerdo al número de fecundaciones normales. Este hecho también fue señalado por Sanbuissho y Threlfall, (1989) y Schellander *et al.* (1990), que aseguran que, además, el SVE tiene una mayor capacidad para mantener el desarrollo embrionario *in vitro* después de la fecundación.

Por otro lado, los resultados de fecundación obtenidos en nuestro trabajo con

SFB+FC (43,3%) son más altos que los obtenidos por Fukushima y Fukui (1985) y Schellander *et al.* (1990) aunque algo más bajos que los de Younis *et al.* (1989). Todos ellos utilizaron SFB y hormonas en el medio de maduración de los oocitos. Las diferencias con los datos ofrecidos por otros autores, son mayores al valorar los resultados obtenidos cuando se utilizó SVE ya que, en nuestro trabajo, se obtuvo un 55,8% de fecundación frente a un 36% de Fukushima y Fukui (1985), 41% de Fukui y Ono (1989) y 50% también de Fukui y Ono, pero utilizando además de ECS, hormonas (FSH. LH y estradiol) y cocultivo con células de la granulosa. Estos resultados indican que la maduración de los oocitos con SVE+FC permite una fecundación normal de los oocitos, o cuando menos similar, a la que se obtiene cuando se suplementan los medios de maduración con hormonas y cocultivos de granulosa.

d.- Influencia de las células del cúmulo.

Las diferencias entre los distintos oocitos, según el número de capas del cúmulo celular que le rodean, se exponen en las **Tablas 26, 27 y 28** del capítulo de RESULTADOS. En ellas se observa que, excepto en los tratamientos control, en los que prácticamente no existió diferencia entre los porcentajes de fecundación, penetración y polispermia entre los tres tipos de oocitos, cuando se suplementó el medio de cultivo con suero y factores de crecimiento, las diferencias entre los oocitos con y sin cúmulo celular fueron muy importantes. En los tres parámetros evaluados existe una gran diferencia entre los oocitos A y B respecto de los C. Este hecho está de acuerdo con los autores que indican que, la existencia del cúmulo celular, es un factor muy importante para que se puedan producir correctamente los procesos que facultan al espermatozoide para penetrar el oocito (Yanagimachi, 1988). Respecto a este punto, Gwatkin *et al.* (1972) demostraron, en el oocito de hamster que, en el proceso de capacitación, el cúmulo celular tiene un papel fundamental. En estudios de este tipo realizados en oocitos de rata Niwa y Chang (1974), observaron que no existieron diferencias en las cifras de penetración y polispermia entre oocitos con y sin cúmulo celular; estos mismos autores reconocen

que este hecho no es común en la mayoría de las especies. En diversos trabajos se ha señalado que las células del cúmulo pueden actuar como barrera contra el gran número de espermatozoides que rodean al oocito durante la fecundación y, sobre todo, favoreciendo la selección, capacitación y reacción acrosómica de los mismos (Yanagimachi, 1988). Sin embargo, Ball *et al.* (1983) señalaron que el cúmulo celular y la expansión de éste favorecen notablemente la fecundación, pero lo más importante, según su criterio, es que el cúmulo transmita o induzca, via cúmulo celular, la actuación de un factor similar al MPGF, descrito hace años por Thibault *et al.* (1977), que es, según estos autores, el verdadero responsable de que se pueda producir la fecundación correctamente.

De la misma manera que se ha descrito en la cerda (Coy, 1991) puede que las proteínas asociadas al estro que se encuentran en el oviducto (Anderson *et al.*, 1992) y que favorecen la capacitación y fecundación *in vitro* (King *et al.*, 1992) actúen disminuyendo la poliespermia en condiciones *in vivo*, necesitando más pruebas en este sentido para asegurar su eficacia en los sistemas *in vitro*. Lo señalado anteriormente podría explicar que, cuando se fecundan *in vitro* oocitos oviductales (post-ovulatorios), las cifras de poliespermia son muy bajas (Leibfried-Rutledge *et al.*, 1986), de la misma manera que sucede en condiciones *in vivo*.

En oocitos bovinos otros autores (Lu *et al.*, 1987; Fukui y Ono, 1989) expusieron oocitos desnudados, mecánicamente o por medio de un tratamiento con hialuronidasa, a la acción de espermatozoides con el fin de averiguar si aumentaban las cifras de penetración y fecundación *in vitro*. Sin embargo, en los resultados de estos autores, como en los mostrados en el presente trabajo, no sólo no aumentaron las cifras de fecundación normal, sino que tampoco lo hicieron las de penetración. Además, por otro lado, existieron penetraciones de espermatozoides e incluso un pequeño porcentaje de fecundación normal; este dato permite asegurar que la zona pelúcida de los oocitos desnudados puede inducir la RA en el espermatozoide. De alguna manera, puede que la suplementación del medio de maduración con factores de crecimiento, confiera al oocito capacidad para ser fecundado, aunque, las pruebas experimentales demuestran que la principal acción

de los factores de crecimiento, junto con la suplementación sérica, se produce en oocitos con cúmulo.

Respecto a las diferencias entre los dos tipos de oocitos con cúmulo (A y B), Leibfried y First (1979) y Fukui (1990), señalaron diferencias en los porcentajes de fecundación. Sin embargo, en nuestro trabajo no existieron unas desigualdades tan marcadas como las señaladas por estos autores. Probablemente, esto sea debido a que, estos autores, no maduraron estos tres tipos de oocitos desde el principio del cultivo, sino que, después del mismo, eliminaron parte de las capas del cúmulo. Este hecho hace que sólomente evalúen la influencia del método de capacitación y fecundación *in vitro* y, por ello, no tienen en cuenta las condiciones de maduración de los oocitos de este tipo específico.

Las diferencias encontradas entre los oocitos A y B en la maduración *in vitro* fueron menores que las que mostraron después de someterlos a la fecundación *in vitro*, con lo que, probablemente, estas diferencias aumentarán en el desarrollo embrionario, tal y como señalaron Shioya *et al.* (1988) y Fukui (1990), con lo que la influencia del cúmulo celular es esencial con vistas a experimentaciones sobre maduración, fecundación y desarrollo embrionario *in vitro*.

Según los datos mostrados en el presente trabajo, la acción de los factores de crecimiento y sueros sobre los oocitos se efectúa al crear un estímulo en el oocito que facilita su maduración y fecundación; puede que estos dos factores tengan distintos mecanismos de actuación, ya que el IGF-1 no produce efectos tan importantes, en la maduración, como el EGF, o que se complementen junto con los sueros para producir la maduración citoplásmica y nuclear, creando las condiciones necesarias para permitir la fecundación *in vitro*.

En este sentido, a falta de mayores estudios, Herlerr *et al.* (1992) que suplementaron el medio de maduración y el de desarrollo embrionario con IGF-1 (en base a la existencia de receptores para este factor desde el estadio embrionario de

1 célula), señalaron que, el IGF-1, era efectivo en el desarrollo embrionario, después de la maduración y fecundación *in vitro*. De la misma manera, Coskum *et al.* (1991) señalaron que los oocitos madurados con EGF eran capaces de desarrollarse sin cocultivos celulares, hasta el estadio de 8 células. Todos estos datos permiten asegurar que los factores de crecimiento juegan un papel importante en estos procesos del desarrollo embrionario temprano.

Finalmente, reuniendo el conjunto de los experimentos efectuados, podemos señalar que, la suplementación de los medios de maduración *in vitro* de oocitos bovinos con factores de crecimiento y sueros, favorece la expansión del cúmulo celular del oocito y su maduración y fecundación *in vitro*, ejerciendo estos efectos por medio de las células del cúmulo celular, por lo que, los oocitos con cúmulo celular completo, serían los más adecuados para efectuar futuras investigaciones en este campo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- LA ADICION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF-1) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGF), AL MEDIO DE MADURACION DE OOCITOS DE ORIGEN VACUNO, FAVORECE:
 - a) LA EXPANSION DEL CUMULO CELULAR.
 - b) LA PROPIA MADURACION Y,
 - c) SU FECUNDACION *IN VITRO*.
- 2.- EL CUMULO CELULAR ES NECESARIO PARA QUE PUEDAN ACTUAR LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA MADURACION Y FECUNDACION *IN VITRO* DE LOS OOCITOS.
- 3.- CUANDO EN EL MEDIO DE MADURACION *IN VITRO* SE AÑADE EGF SOLO O EGF MAS IGF-1, LA EXPANSION DEL CUMULO CELULAR QUE SE PRODUCE SIRVE COMO DATO ORIENTATIVO DEL ESTADO DE MADURACIÓN DEL OOCITO.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA.

- ABERDAN, E. y N. DEKEL.- Activators of protein kinase C stimulate meiotic maturation of rat oocyte.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **132**: 570-574, 1985.
- ADASHI, E.Y., C.E. RESNICK, M.E. SVOBODA y J.S. VAN WYK.- A novel role for somatomedin-C in the cytodifferentiation of ovarian granulosa cells.
Endocrinology **155**: 1227-1229, 1984.
- ADASHI, E.Y., C.E. RESNICK, A.J. D'ERCOLE, M.E. SVOBODA y J.S. VAN WYK.- Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function.
Endocrine Rev. **6**: 400-420, 1985.
- ADASHI, E.Y. y C.E. RESNICK.- Antagonistic interactions of transforming growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation.
Endocrinology **199**: 1879-1881, 1986.
- ADASHI, E.Y., C.E. RESNICK, E.R. HERNANDEZ, M.E. SVOBODA y J.S. VAN WYK.- Characterization and regulation of a specific cell membrane receptor for somatomedin-C/insulin-like growth factor 1 in cultured rat granulosa cells.
Endocrinology **122**: 194-201, 1988.
- AMADOR, A.G. y A. BARTKE.- Potentiation by epidermal growth factor of the *in vitro* HCG stimulation of testicular steroidogenesis in hamsters.
Rev. Esp. Fisiol. **48**: 19-24, 1992.
- ANDERSON, E. y D.F. ALBERTINI.- Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary.
J. Cell Biol. **71**: 680-686, 1976.
- ANDERSON, S.H., R.S. KING y G.J. KILLIAN.- Effect of *in vitro* synthesized estrus-associated protein on sperm capacitation, motility and agglutination.
12th Internacional Congress on Animal Reproduction: 396-397, 1992.
- ANGERVO, M., R. KOISTINEN y M. SEPPÄLÄ.- Epidermal growth factor stimulates production of insulin-like growth factor-binding protein-I in human granulosa-luteal cells.
J. Endocrinol. **134**: 127-131, 1992.

- ARLOTTO, T.M., M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE y N.L. FIRST.- Size distribution and meiotic competence of bovine primary oocytes from two localities in the ovary. *Theriogenology* **33**: 188, 1990.
- ARMSTRONG, D.T., X. ZHANG, B.C. VANDERHYDEN y F. KHAMSI.- Hormonal actions during oocyte maturation influence fertilization and early embryonic development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **626**: 137-158, 1991.
- AUSTIN, C.R.- Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* **4**: 581, 1951.
- AUSTIN, C.R.- The capacitation of mammalian sperm. *Nature* **170**: 326, 1952.
- AX, R.L., M.E. BELLIN y H.J. GRIMEK.- Properties and regulation of synthesis of glycosaminoglycans by the ovary. *Proceedings of the Fifth Ovarian Workshop*. Editado por W.Y. Laramie, 1984.
- BAKER, R.D. y C. POLGE.- Fertilization in swine and cattle. *Can. J. Anim. Sci.* **56**: 105-119, 1976.
- BAKER, T.- Oogenesis and ovulation. En: *Reproduction in mammals*, editado por C. Austin y R. Short. Cambridge: Cambridge University Press, 1982, p. 14-45.
- BAKER, T. y L. FRANCHI.- The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *J. Reprod. Fertil.* **14**: 511-513, 1967.
- BALBONI, G.C., G.B. VANELLI, T. BARNI, C. ORLANDO y M. SERIO.- Transferrin and somatomedin C receptors in the human ovarian follicles. *Fertil. Steril.* **46**: 796, 1987.
- BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.W. LENZ, R.L. AX, B.D. BAVISTER y N.L. FIRST.- Factors affecting successful *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* **28**: 717-725, 1983.
- BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.L. AX y N.L. FIRST.- Maturation and fertilization of bovine oocyte *in vitro*. *J. Dairy Sci.* **67**: 2775-2785, 1984.

- BARANAO, J.L. y J.M. HAMMOND.- Comparative effects of insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **124**: 484-490, 1984a.
- BARANAO, J.L. y J.M. HAMMOND.- Serum-free medium enhances growth and differentiation of cultured pig granulosa cells.
Endocrinology **116**: 51-58, 1984b.
- BAR-AMI, S. y A. TSAFRIRI.- Acquisition of meiotic competence in the rat: Role of gonadotropin and estrogen.
Gam. Res. **4**: 463-472, 1981.
- BARNES, F.L., J.J. PARRISH, J.L. SUSKO-PARRISH y N.L. FIRST.- Morphological and molecular aspects of early development in the bovine.
Theriogenology **27**: 210, 1987.
- BAVISTER, B.D.- Environmental factors important for *in vitro* fertilization in the hamster.
J. Reprod. Fertil. **18**: 544-545, 1969.
- BAVISTER, B.D. y R. YANAGIMACHI.- The effects of the sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*.
Biol. Reprod. **16**: 228-237, 1977.
- BAVISTER, B.D.- Analysis of culture media for *in vitro* fertilization and criteria for success. En: Fertilization and embryonic development *in vitro*, editado por L. Mastroianni Jr. y J.D. Biggers. New York: Plenum Press, 1981, p. 42-58.
- BAVISTER, B.D.- Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. En: The mammalian preimplantation embryo. Regulation of growth and differentiation *in vitro*, editado por B.D. Bavister. New York: Plenum Press, 1987, p. 219-249.
- BEDFORD, J.M.- Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **8**: 19-26, 1969.
- BEHNKE, J.E.- Bovine sperm capacitation and oocyte *in vitro* maturation.
Tesis doctoral. Minesotta University. 1987.

- BERG, U. y G. BREM.- Developmental rates of *in vitro* produced IVM-IVF bovine oocytes in different cell co-culture systems.
Theriogenology **33**: 195, 1990.
- BICSAK, T.A., E.M. TUCKER, S. CAPPEL, J. VAUGHAN, J.RIVIER, W. VALE y A.J.W. HSUEH.- Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis.
Endocrinology **119**: 2711-2719, 1986.
- BICSAK, T.A., S.B. CAJANDER, W. VALE y A.J.W. HSUEH.- Inhibin: studies of stored and secreted forms by biosynthetic labelling and immunodetection in cultured rat granulosa cells.
Endocrinology **122**: 741-748, 1988.
- BLANDAU, R.J. y P. VERDUGO.- An overview of gamete transport-comparative aspects.
En: Ovum transport and fertility regulation, editado por M.K.J. Harper, C.J. Pauerstein, C.E. Adams, C.J. Coutinho, H.B. Croxato, D.M. Patton. Copenhagen: Scriptor, 1976, p. 138.
- BLEIL J.D. y P.M. WASSARMAN.- Sperm-egg interactions in the mouse. Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glicoprotein.
Devl. Biol. **95**: 317-324, 1983.
- BLUNDELL, R.M. y R.E. TASCA.- Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors.
Nature **287**: 781, 1980.
- BONDIOLI, K.R. y WRIGHT, R.W. JR.- *In vitro* fertilization of bovine oocytes by spermatozoa capacited *in vitro*.
J. Anim. Sci. **57**: 1100-1005, 1983.
- BORNSLAEGER, E.A., P. MATTEI y R.M. SCHULTZ.- Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation.
Dev. Biol. **114**: 453-462, 1986.
- BRACKETT, B.G.- A review of bovine fertilization *in vitro*.
Theriogenology **19**: 1-15, 1983.
- BRACKETT, B.G., Y.K. OH, J.F. EVANS y W.J. DONAWICK.- Fertilization and early development of cow ova.
Biol. Reprod. **23**: 189-205, 1980.

- BRACKETT, B.G., D. BOUSQUET, M.L. BOICE, W.J. DONAWICK, J.F. EVANS y M.A. DRESSEL.- Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. Biol. Reprod. **27**: 147-158, 1982.
- BRACKETT, B.G., A.I. YOUNIS, R.A. FAYRER-HOSKEN.- Enhanced viability after *in vivo* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of luteinizing hormone. Fertil. Steril. **52**: 319-324, 1989.
- BRAMBELL, F.- The development and morphology of the gonads of the mouse. Part I. The morphogenesis of the indifferent gonad and of the ovary. Proc. R. Soc. Lond. **101**: 301-409, 1927.
- BRINSTER, R.L.- Protein content of the mouse embryo during the first five days of development. J. Reprod. Fertil. **10**: 227-240, 1967.
- BRINSTER, R.L.- Culture of two-cell rabbit embryos to morulae. J. Reprod. Fertil. **21**: 17-22, 1970.
- BRUCKER, C., N.J. ALEXANDER, G.D. HODGEN y B.A. SANDOW.- Transforming growth factor- α augments meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. Mol. Reprod. Dev. **28**: 94-98, 1991.
- BUCCIONE, R., B.C. VANDERHYDEN, P.J. CARON y J.J. EPPIG.- FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus *in vitro* is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. Dev. Biol. **138**: 16-25, 1990.
- BYSKOV, A.- Primordial germ cells and regulation of meiosis. En: Reproduction in mammals, editado por C. Austin, R. Short. Cambridge: Cambridge University Press, 1982, p. 1-16.
- CAHILL, L.P. y J.K. FLINDAY.- Inhibition of folliculogenesis by ovine follicular fluid in PMSG-treated ewes. Biol. Reprod. **30**: 36, 1984.
- CALISSANO, P., A. CATTANEO, L. ALOE y R. LEVI-MONTALCINI.- The nerve growth factor (NGF). En: Hormonal proteins and peptides, editado por H.C. Li. Orlando: Academic Press, 1984, p. 2-56.

- CARPENTER, G. y S. COHEN.- Epidermal growth factor.
Ann. Rev. Biochem. **48**: 193, 1979.
- CARSON, R.S., Z. ZHANG, L.A. HUTCHINSON, A.C. HERRINGTON y J.K. FINDLAY.- Growth factors in ovarian function.
J. Reprod. Fertil. **85**: 735-746, 1989.
- CHABOT, J.G., R. ST-ARNAUD, P. WALKER y G. PELLETIER.- Distribution of epidermal growth factor receptor in the rat ovary.
Mol. Cell. Endocrinol. **44**: 99-108, 1986.
- CHANG, M.C.- Fertilizing capacity of spermatozoa into the fallopian tubes.
Nature **168**: 697, 1951.
- CHANG, M.C.- The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation, activation, fertilization and subsequent development in the Fallopian tubes.
J. Exp. Zool. **128**: 379-405, 1955.
- CHANG, M.C.- Fertilization of rabbit ova *in vitro*.
Nature **184**: 466-467, 1959.
- CHANNIG, C.P. y A. TSAFRIRI.- Mechanism of action of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovary *in vitro*.
Metabolism. **26**: 413-468, 1977.
- CHENG, W.T.K., R.M. MOOR y C. POLGE.- *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and *in vitro*.
Theriogenology **25**: 146, 1986.
- CHIAN, R.C., H. NAKAHARA, K. NIWA y H. FUNAHASHI.- Fertilization and early cleavage *in vitro* of ageing bovine oocytes after maturation in culture.
Theriogenology **37**: 665-672, 1992.
- COHEN, S.- Isolation of a submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal.
J. Biol. Chem. **237**: 1555-1562, 1962.
- COSKUM, S., A. SANBUISSHO, Y.C. LIN y Y RIKIHISA.- Fertilizability and subsequent developmental ability of bovine oocytes matured in medium containing epidermal growth factor (EGF).
Theriogenology **36**: 488-494, 1991.

- COY, P.- Fecundación *in vitro* en la especie porcina: influencia de diferentes condiciones de cocultivo.
Tesis doctoral. Univ. Murcia, 1991.
- CRAN, D.G. y W.T.K. CHENG.- The cortical reaction in pig oocytes during *in vivo* and *in vitro* fertilization.
Gamete Res. **13**: 241-251, 1986.
- CRAN, D.G.- Cortical granules during oocyte maturation and fertilization.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **38**: 49-62, 1989.
- CRITSER, E.S., M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, W.H. EYESTONE, P.L. NORTHEY y N.L. FIRST- Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*.
Theriogenology **25**: 150, 1986.
- CROZET, N.- Ultrastructural aspects of *in vivo* fertilization in the cow.
Gamete. Res. **10**: 241-251, 1984.
- CZECH, M.P.- Structural and functional homologies in the receptors for insulin and insulin-like growth factors.
Cell **31**: 8, 1982.
- DAS, K., L.E. STOUT, H.C. HENSLEIGH, G.E. TAGATZ, W.R. PHIPPS y B.S. LEUNG.- Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes.
Fertil. Steril. **55**: 1000-1004, 1991.
- DAS, K., W.R. PHILIPS, H.C. HENSLEIGH y G.E. TAGGATZ.- EGF in human follicular fluid stimulates mouse oocytes maturation *in vitro*.
Fertil. Steril. **57** (4): 895-901, 1992.
- DEKEL, N. y P.F. KRAICER.- Luteinizing hormone induction of mucopolysaccharide secretion by rat cumulus oophorus *in vitro*.
J. Med. Sci. **13**: 612, 1977.
- DEKEL, N. y W.H. BEERS.- Development of the rat oocyte *in vitro*: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus.
Dev. Biol. **75**: 247-254, 1980.

- DEKEL N., T.S. LAWRENCE, N.B. GILULA y W.H. BEERS.- Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complexes and the regulation of oocyte maturation by LH.
Dev. Biol. **86**:356-362, 1981.
- DEKEL, N. y I. SCHERIZLY.- Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes.
Endocrinology **116**: 512-516, 1985.
- DEKEL, N.- Involvement of protein kinases in the induction of oocyte maturation in the rat. Symposium on Fertilization in Mammals 4, 1989.
- De LOOS, F., P. Van MAURIK, T. Van BENEDEN y Th. A.M. KRUIP.- Structural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro*.
Mol. Reprod. Dev. **31**: 208-214, 1992.
- D'ERCOLE, A.J. y L.E. UNDERWOOD.- Growth factors in fetal growth and developmental. En: Fetal endocrinology, editado por M.J. Novy y J.A. Resko. New York: Academic Press, 1981, p. 155-182.
- DEUEL, T.F. y J.S. HUANG.- Platelet-derived growth factor.
J. Clin. Invest. **74**: 669, 1984.
- DIELEMAN, S.J., Th.A.M. KRUIP, P. FONTIGNE, W.H.R. de JONG y G.C. VAN DER WEIDEN.- Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone.
J. Endocrinol. **97**: 31-42, 1983.
- DiZEREGA, G.S., J.D. CAMPEU, E.L. UJITA, O.R. KLING, R.P. MARS, R.L. LOBO y R.M. NAKAMURA.- Possible role for a follicular fluid protein in the intraovarian regulation of folliculogenesis.
Semin. Reprod. Endocrinol. **1**: 309, 1983.
- DOMINKO, T. y N.L. FIRST.- Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence is affected by gonadotropins.
Theriogenology **37**: 203, 1992.
- DONAHUE, R.- Maturation of the mouse oocyte *in vitro* I. Secuence and timing of nuclear progression.
J. Exp. Zool. **169**: 237-250, 1968.

- DOWNS, S.M., S.A.J. DANIEL y J.J. EPPIG.- Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte by follicle stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin.
J. Exp. Zool. **245**: 86-96, 1988.
- DOWNS, S.M.- Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and the cumulus oophorus *in vitro*.
Biol. Reprod. **41**: 371-379, 1989.
- DOWNWARD, J., P. PARKER y M.D. WATERFIELD.- Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor.
Nature **311**: 483, 1984.
- DRIANCOURT, M.A.- Follicular dynamics in sheep and cattle.
Theriogenology **35**: 55-79, 1991.
- DUCIBELLA, T., E. ANDERSON, D.F. ALBERTINI, J. AALBERG y S. RANGARAJAN.- Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation.
Devl. Biol. **130**: 184-197, 1988.
- EBENSBERGER, C. y C. BARROS.- Changes at the hamster oocyte surface from the germinal vesicle stage to ovulation.
Gamete Res. **9**: 387-397, 1984.
- ECHTERNKAMP, S.E., L.J. SPICER, K.E. GREGORY, S.F. CANNING y J.M. HAMMOND.- Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins.
Biol. Reprod. **43**: 8-14, 1990.
- EDWARDS, R.G.- Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes.
Nature, **208**: 349-351, 1965.
- EDDY, E., J. CLARK, J. GONG y B. FENDERSON.- Origin and migration of primordial germ cells in mammals.
Gamete Res. **4**: 333-362, 1981.
- ENG, L.A., E.T. KORNEGAY, J. HUNTINGTON y T. WELLMAN.- Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*.
J. Reprod. Fert. **76**: 657-662, 1986.

- EPPIG, J.J.- The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion.
Devl. Biol. **89**: 268-272, 1982.
- EPPIG, J.J., R.F. FETER, P.F. WARD-BAILEY y R.M. SCHULTZ.- Inhibition of oocyte maturation in the mouse: participation of cyclic AMP, steroids and a putative maturation inhibitory factor.
Dev. Biol. **100**: 39, 1983.
- EPPIG, J.J. y S.M. DOWNS.- Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation.
Biol. Reprod. **30**: 1-11, 1984.
- EPPIG, J.J.- The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse.
J. Reprod. Fertil. **38**: 3-8, 1989.
- EPSTEIN, M.L., W.H. BEERS y N.B. GILULA.- Cell communication between the rat cumulus oophorus and the oocyte.
J. Cell Biol. **70**: 302a, 1976.
- EYESTONE, W.H. y N.L. FIRST.- Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium.
J. Reprod. Fertil. **85**: 715-720, 1989a.
- EYESTONE, W.H. y N.L. FIRST.- Variation in bovine embryo development *in vitro* due to bulls.
Theriogenology **31**: 191, 1989b.
- EYESTONE, W.H.- Comunicación personal. 1992.
- FARIN, C.E.- Comunicación personal. 1991.
- FARIN, C.E. y L. YANG.- Inhibition of germinal vesicle breakdown by 5,6-dichlorobenzimidazole riboside in bovine oocytes matured *in vitro*.
Theriogenology **37**: 208, 1992.
- FAYRER-HOSKEN, R.A. y A.B. CAUDLE.- Bovine *in vitro* fertilization: will the technique be practical?.
Embryo transfer **5**: 1-5, 1991.

- FENG, P., K.J. CATT y M. KNETCH.- Transforming growth factor- β regulates the inhibitory actions of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **261**: 14167-14170, 1986.
- FENG, P., M. KNECHT y K.J. CATT.- Hormonal control of epidermal growth factor receptors by gonadotropins during granulosa cell differentiation. *Endocrinology* **122**: 181-186, 1987.
- FENG, P., K.J. CATT y M. KNETCH.- Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* **122**: 181-186, 1988.
- FIRST, N.L. y J.J. PARRISH.- *In vitro* fertilization in ruminants. *J. Reprod. Fert. (Suppl. 34)*: 151-165, 1987.
- FIRST, N.L. y J.J. PARRISH.- Sperm maturation and *in vitro* fertilization. 11th International Congress on A.R. and A.I. Dublin, pp 161-168, 1988.
- FLECHON, J.E.- Sperm surface changes during the acrosome reaction as observed by freeze-fracture. *Am. J. Anat.* **174**: 239-248, 1985.
- FOLMAN, Y., M. ROSENBERG, I. ASCARELLI, M. KAIM y Z. HERZ.- The effect of dietary and climatic factors on fertility, and on plasma progesterone and oestradiol-17 β levels in dairy cows. *J. steroid Biochem.* **19**: 863-868, 1983.
- FOOTE, W.E. y C. THIBAUT.- Recherches experimentels sur la maturation *in vitro* des ovocytes de truie et de veau. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* **9**: 329-349, 1969.
- FRANCHI, L., A. MANDL y S. ZUCKERMAN.- The development of the ovary and the process of oogenesis. En: *The ovary*, editado por S. Zukerman, 1962, p. 1-88.
- FRANCHIMONT, P., M.T. HAZEE-HAGELSTEIN, CH. CHARLET-RENARD y J.M. JASPAR.- Effect of mouse epidermal factor on DNA and protein synthesis, progesterone and inhibin production by bovine granulosa cells in culture. *Acta endocrinol. Copenh.* **111**: 122-127, 1986.

- FUKUDA, A., y W.E. ROUDEBUSH.- Platelet activating factor enhances the *in vitro* acrosome reaction in rabbit spermatozoa.
Biol. Reprod. **46** (Suppl. 1): 93, 1992.
- FUKUI, Y. e Y. SAKUMA.- Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells.
Biol. Reprod. **22**: 669-673, 1980.
- FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA, Y. TERAOKA y H. ONO.- Effect of gonadotropin, steroids and culture media on bovine oocyte maturation.
Theriogenology **18**: 161-175, 1982.
- FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA y H. ONO.- Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation *in-vitro*.
J. exp. Zool. **226**: 137-142, 1983.
- FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA y H. ONO.- Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures.
Theriogenology **20**: 651-660, 1983.
- FUKUI, Y., K. IMAI, N.F. ALFONSO y H. ONO.- Follicle culture enhances fertilizability and cleavage of bovine oocytes matured *in vivo*.
J. Anim. Sci. **64**: 935-941, 1987.
- FUKUI, Y. y H. ONO.- *In-vitro* development to blastocyst of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes.
Vet. Rec. **122**: 282-283, 1988.
- FUKUI, Y.- Effects of sera and steroid hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro* and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells.
J. Anim. Sci. **67**: 1318-1323, 1989.
- FUKUI, Y. y H. ONO.- Effects of sera, hormones and of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes.
J. Reprod. Fert. **86**: 501-506, 1989.
- FUKUI, Y.- Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and developmental competence of bovine oocytes matured *in vitro*.
Mol. Reprod. Dev. **26**: 40-46, 1990.

- FUKUSHIMA, M., y Y. FUKUI.- Effects of gonadotropin and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured *in vitro*.
Anim. Reprod. Sci. **9**: 323-332, 1985.
- FULKA, J. y J. MOTLIK.- *In-vitro* maturation.
Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. y A.I. Madrid **11**: 55-62, 1980.
- FULKA Jr, J., A. PAVLOK y J. FULKA.- *In-vitro* fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture.
J. Reprod Fert. **64**: 495-499, 1982.
- FUNAHASHI, H., Y. AOYAGI, T. TAKEDA y T. ONIHARA.- Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*.
Theriogenology **36**: 427-434, 1991.
- GANDOLFI, F. y R.M. MOOR.- Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviductal cells.
J. Reprod. Fert. **81**: 23-28, 1987.
- GANONG, W.F.- The thyroid gland. En: Review of medical physiology, editado por W.F. Ganong. Conneticut: Appleton-Lange, 1991, p. 305-306.
- GARCIA-SAINZ, J.A.- Cell responsiveness and protein kinase C: receptors, G proteins, and membrane effectors.
NIPS **6**: 169-173, 1991.
- GILULA N.B., M.L. EPSTEIN y W.H. BEERS.- Cell-to-cell comunicacion and ovulation: a study of the cumulus-oocyte complex.
J. Cell. Biol. **78**: 58-75, 1978.
- GO, K.J. y D.P. WOLF.- Albumin-mediated changes in the sperm sterol contents during capacitation.
Biol. Reprod. **32**: 145-153, 1985.
- GONDOS, B.- Oogonia and oocytes in mammals. En: The vertebrata ovary, editado por R. Jones, New York: 1978, Plenum Press, 1978, p. 83-120.
- GONÇALVES, P.B. y C.N. GRAVES.- Interaction between cAMP, diacylglycerol and Ca^{2+} -calmodulin pathways in the regulation of cumulus expansion.
Biol. Reprod. **46** (Suppl. 1): 69, 1992.

- GORDON, I.- *In vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of cattle ova.
Embryo Transfer Newsletter, 8: 6-11, 1990.
- GOSPODAROWICZ, D.- Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary.
J. Biol. Chem. **250**: 2515-2520, 1975.
- GOSPODAROWICZ, D. y J.S. MORGAN.- Growth factors in mammalian cell culture.
Ann. Rev. Biochem. **45**: 531-558, 1976.
- GOSPODAROWICZ, D., C.R. ILL y C.R. BIRDWELL.- Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation *in vitro*. 1. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF.
Endocrinology **100**: 1108-1120, 1977.
- GOSPODAROWICZ, D., G. GREEMBURG, H. BIALECHI y B.R. ZETTER.- Factors involved in the modulation of cells proliferation *in vivo* and *in vitro*: the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells.
In Vitro **14**: 85-118, 1978.
- GOSPODAROWICZ, D. y H. BIALECKI.- Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin.
Endocrinology **104**: 757-764, 1979.
- GOTO, K., Y. KAJIHARA, S. KOSAKA, M. KOBAYASHI, Y. NAKANISHI y K. OGAWA.- Pregnancy after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation *in vitro* and their transfer to the cow uterus.
Theriogenology **29**: 251, 1988.
- GRAHAM, J.K. y FOOTE, R.H.- *In vitro* fertilization of zona-free hamster ova by liposome-treated bovine sperm: a fertility assay.
Biol. Reprod. **30** (Suppl. 1): 112, 1984.
- GREVE, T., D. BOUSQUET, W.A. KING y K.J. BETTERIDGE.- *In vitro* fertilization and cleavage of *in vivo* matured bovine oocytes.
Theriogenology **22**: 151-165, 1984.
- GREVE, T., K.P. XU, H. CALLESEN y P. HYTTTEL.- *In vivo* development of *in vitro* fertilized bovine oocytes matured *in vivo* versus *in vitro*.
J. *in vitro* Fert./Embryo Transfer **4**: 281-285, 1987.

- GWATKIN, R.B.L., O.F. ANDERSEN y C.F. HUTCHISON.- Capacitation of hamster spermatozoa *in vitro*: the role of cumulus components.
J. Reprod. Fert. **30**: 389-394, 1972.
- GWATKIN, R.B.L. y A.A. HAIDRI.- Requirements for the maturation of hamster oocytes *in vitro*.
Exp. Cell Res. **76**: 1-7, 1973.
- GWATKIN, R.B.L. y O.F. ANDERSEN.- Hamster oocyte maturation *in vitro* inhibition by follicular components.
Life Sci. **19**: 527-536, 1976.
- HAFEZ, E.S.E., M.L. LEVASSEUR y C. THIBAUT.- Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. En: Reproduction in farm animals, editado por E.S.E. Hafez. 1980, p. 150-168.
- HAINAUT, P., A. KOWALSKI, Y. LE MARCHAND-BRUSTEL, S. GIORGETTI, N. GAUTIER y E. VAN OBBERGHEN.- Effects of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and progesterone on glucose and amino acid uptake in *Xenopus laevis* oocytes.
Mol. Cell. Endocrinol. **75**: 133-139, 1991.
- HAINAUT, P., S. GIORGETTI, A. KOWALSKI, R. BALLOTTI y E. VAN OBBERGHEN.- Antibodies to phosphotyrosine injected to *xenopus laevis* oocytes modulate maturation induced by insulin/IGF-I.
Exp. Cell. Res. **195**: 129-136, 1991.
- HAMILTON, W.J. y J.A. LAING.- Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation.
J. Anat. **80**: 194-204, 1946.
- HAMMOND J.M., J.L.S. BARANAO, D. SKALERIS, A.B. KNIGHT, J.A. ROMANUS y M.M. RECHLER.- Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells.
Endocrinology **117**: 2553-2555, 1985.
- HARPER, M.J.K.- Sperm and egg transport. En: Reproduction in mammals. I. Germ cells and fertilization, editado por C.R. Austin y R.V. Short. Cambridge: University press, 1982, p. 102-127.

- HARPER, M.J.K.- Gamete and zygote transport. En: The physiology of reproduction, editado por E. Knobil y J.D. Neill. New York: Raven press, 1988, p. 103-134.
- HARPER, K.M. y B.G. BRACKETT.- Enhanced oocyte bovine quality after *in vitro* maturation (IVM) with insulin-like growth factor-I (IGF-I) and gonadotropins. Biol. Reprod. **46** (Suppl. 1): 67, 1992.
- HENSLEIGH, H.C. y A.G. HUNTER.- Influence of FSH and HCG upon the *in vitro* maturation of bovine oocytes. Theriogenology **19**: 133, 1983.
- HENSLEIGH, H.C. y A.G. HUNTER.- *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. J. Dairy Sci. **68**: 1456-1562, 1985.
- HERLERR, A., A. LUCAS-HANN y H. NIEMANN.- Effects of insulin-like growth factor-I on *in vitro* production of bovine embryos. Theriogenology **37**: 1213-1224, 1992.
- HERNANDEZ, E.R., R.R. TWARDZIK, A. PURCHIO y E.Y. ADASHI.- Gonadotropin-dependent ovarian transforming growth factor- β gene expression. Biol. Reprod. **36**: 58, Abstr. 35, 1987.
- HERNANDEZ, E.R., C.E. RESNICK, M.E. SVOBODA, J.J. VAN WYK, D.W. PAYNE y E.Y. ADASHI.- Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. Endocrinology **122**: 1603-1612, 1988.
- HERZ, Z., D. NORTHDEY, M. LAWYER y N.L. FIRST.- Acrosome reaction of bovine spermatozoa in vivo, sites and effects of stages of the estrous cycle. Biol. Reprod. **32**: 1163-1168, 1985.
- HILL, D.J.- Growth factors and their cellular actions. J. Reprod. Fertil. **85**: 723-734, 1989.
- HILLENSJO, T., C. EKHOLM y K. AHREN.- Role of cyclic AMP in oocyte maturation and glycolysis in the pre-ovulatory rat follicle. Acta Endocrinol (Copenhagen) **87**: 377-388, 1978.

- HILLENSJO, T., y W.L. Le MARIE.- Gonadotropin releasing hormone agonist stimulate meiotic maturation of follicle enclosed rat oocytes *in vitro*.
Nature, **287**: 145-146, 1980.
- HORII, Z.I. y S. VARON.- Nerve growth factor action on membrane permeation to exogenous substrates in dorsal root ganglionic dissociates from the chick embryo.
Brain Res. **124**: 121, 1977.
- HSU, C. y J.M. HAMMOND.- Gonadotropins and estradiol stimulate immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine cells *in vitro*.
Endocrinology **120**: 198-207, 1987.
- HSU, C.J., S.D. HOLMES y J.M. HAMMOND.- Ovarian epidermal growth factor activity concentration in porcine follicular fluid during follicular enlargement.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **147**: 242-247, 1987.
- HSUEH, A.J.W., T.H. WELSH y P.B.C. JONES.- Inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis by epidermal growth factor.
Endocrinology **108**: 2002-2004, 1981.
- HUNTER, R.H.F., R.A.S. LAWSON y L.E.A. ROWSON.- Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in cattle.
J. Reprod. Fert. **30**: 325-328, 1972.
- HUNTER, R.H.F. Physiology and technology of reproductions in female domestic animals, editado por R.F.H. Hunter, London: Academic Press, 1980, p. 227-253.
- HUNTER, R.H.F. e I. WILMUT.- Sperm transport in the cow. Peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct.
Reprod. Nutr. Dévelop. **24**: 597-608, 1984.
- HUNTER, T.- The epidermal growth factor receptor gene and its product.
Nature **311**: 414, 1984.
- HYTTEL, P.- Bovine cumulus-oocyte disconnection *in vitro*.
Anat. Embryol. **176**: 41-44, 1987.
- HYTTEL, P., K.P. XU, S. SMITH y T. GREVE.- Ultrastructure of *in-vitro* oocyte maturation in cattle.
J. Reprod. Fert. **78**: 615-625, 1986b.

- HYTTEL, P., K.P. XU, S. SMITH, H. CALLESEN y T. GREVE.- Ultrastructure of the final nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro*.
Anat. Embryol. **176**: 35-40, 1987.
- HYTTEL, P.- Oocyte maturation and fertilization in cattle. Ultrastructural aspects. Tesis doctoral. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, 1988.
- HYTTEL, P., K.P. XU y T. GREVE.- Ultrastructural abnormalities of *in vitro* fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes.
Anat. Embryol. **177**: 1988.
- HYTTEL, P., T. GREVE y H. CALLESEN.- Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **38**: 35-47, 1989.
- ILLERA, M.J.- Comunicación personal. 1992.
- ILLERA, M.J., J. ARELLANO, P. LORENZO, J. SANCHEZ, G. SILVAN y J.C. ILLERA.- Porcine oocyte maturation with EGF (Epidermal growth factor).
8° A.E.T.E. Lyon, France. p. 170, 1992.
- IRITANI, A. y K. NIWA.- Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture.
J. Reprod. Fert. **50**: 119-121, 1977.
- IRITANI, A., M. KASAI, K. NIWA y H.B. SONG.- Fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium.
J. Reprod. Fert. **70**: 487-492, 1984.
- JAGIELLO, G.J., M. DUCAYEN, W. MILLER, J. GRAFFEO y J.S. FANG.- Stimulation and inhibition with LH and other hormones of female mammalian meiosis *in vitro*.
J. Reprod. Fertil. **43**: 9-22, 1975.
- JAGIELLO, G., J. GRAFFEO, M. DUCAYEN y R. PROSSER.- Further studies of inhibitors of *in vitro* mammalian oocytes maturation.
Fertil. Steril. **28**: 476-481, 1977.
- JAMES, R. y R.A. BRADSHAW.- Polypeptide growth factors.
Ann. Rev. Biochem. **53**: 259-292, 1984.

- JIANG, S., X. YANG y R.H. FOOTE.- Sperm capacitation procedures for *in vitro* fertilization and developmental of bovine oocytes.
Theriogenology 37: 230, 1992.
- JONES, R.E.- Control of selection. En: The vertebrate ovary, editado por R.E. Jones. New York: Plenum Press, 1980, p. 763.
- JONES, P.B.C., T.H. WELSH Jr. y A.J.W. HSUEH.- Regulation of ovarian progestin production by epidermal growth factor in cultured rat granulosa cells.
J. Biol. Chem. 257: 11268-11273, 1982.
- KAJIHARA, Y., N. KOMETANI, S. KOBAYASHI e Y. SHITANAKA.- Pregnancy rates and births after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from *in vitro* fertilization of *in vitro* matured follicular oocytes.
Theriogenology 33: 264, 1990.
- KAJIHARA, Y., E.G. BLAKEWOOD, M.W. MYERS, N. KOMETANI, K. GOTO y R.A. GODKE.- *In vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves.
Theriogenology 35: 220, 1991.
- KATSKA, L., y Z. SMORAG.- Number and quality of oocytes in relation to age of cattle.
Anim. Reprod. Sci., 7: 451-460, 1984.
- KATSKA, L.- Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle.
Anim. Reprod. Sci. 7: 461-463, 1984.
- KATSKA, L. y Z. SMORAG.- The influence of culture temperature on *in vitro* maturation of bovine oocytes.
Anim. Reprod. Sci. 9: 205-212, 1985.
- KIM, C.I., J.E. ELLINGTON y R.H. FOOTE.- Maturation, fertilization and development of bovine oocytes *in vitro* using TCM 199 and a simple defined medium with co-culture.
Theriogenology 33: 433-440, 1990.
- KIM, S.K. y H.K. PARK.- Studies on the *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes.
Theriogenology 33: 267, 1990.

- KIMELMAN, D. y M. KIRSCHNER.- Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early xenopus embryo.
Cell **51**: 869-871, 1987.
- KING, G.L. y C.R. KAHN.- Effect of insulin on growth *in vivo* and cells in culture. En: Control of animal cell proliferation, editado por A.L. Boyton y H.L. Leffert. Orlando, 1985, p. 201-249.
- KING, W.A., D. BOUSQUET, T. GREVE. y A.K. GOFF.- Meiosis in bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*.
Acta Vet. Scand. **27**: 267-279, 1986.
- KING, R.S., S.H. ANDERSON y G.J. KILLIAN.- Bovine estrus-associated protein facilitates sperm capacitation and fertilizing ability.
12th Internacional Congress on Animal Reproduction: 487-489, 1992.
- KRUIP, Th.A.M., D.G. CRAN, T.H. VAN BENEDEN y S.J. DIELEMAN.- Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*.
Gamete Res. **8**: 29-47, 1983.
- KRUIP, Th.A.M.- Comunicación personal, 1988.
- LAIHO, M., O. SAKSELA y J. KESKI-OJA.- Transforming growth factor β alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts.
Exp. Cell Res. **164**: 339, 1986.
- LAMBERT, R.D., C. BERNARD, J.E. RIOUX, R. BELAND, D. D'AMOURS y A. MONTREUIL.- Endoscopy in cattle by the paraloumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration.
Theriogenology **20**: 149-161, 1983.
- LAMBERT, R.D., M.A. SIRAD, C. BERNARD, R. BELAND, J.E. RIOUX, y P. LECLERC.- *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and collected at laparoscopy.
Theriogenology **25**: 117-133, 1986.
- LAURINCIK, J.- Compactness of corona cell layer.
Workshops of the 12th Internacional Congress on Animal Reproduction, 1992.

- LEE, C.N. y R.L. AX.- Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract.
J. Dairy Sci. **67**: 2006-2009, 1984.
- LEIBFRIED, M.L. y N.L. FIRST.- Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*.
J. Anim. Sci. **48**: 76-86, 1979.
- LEIBFRIED, M.L. y N.L. FIRST.- Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes *in vitro*.
Biol. Reprod. **23**: 699-704, 1980.
- LEIBFRIED, M.L. y B.D. BAVISTER.- Effects of epinephrine and hipotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster.
J. Reprod. Fert. **66**: 87-93, 1982.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., E.S. CRITSER y N.L. FIRST.- Effect of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes.
Biol. Reprod. **35**: 850-857, 1986.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., E.S. CRITSER, W.H. EYESTONE, D.L. NORTHEY y N.L. FIRST.- Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*.
Theriogenology **25**: 164-165, 1986.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., E.S. CRITSER, W.H. EYESTONE, D.L. NORTHEY y N.L. FIRST.- Developmental potential of bovine oocytes matured *in vitro* or *in vivo*.
Biol. Reprod. **36**: 376-383, 1987.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., E.S. CRITSER, J.J. PARRISH y N.L. FIRST.- *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes.
Theriogenology **31**: 61-74, 1989.
- LENZ, R.W., R.L. AX, H.J. GRIMECK y N.L. FIRST.- Proteoglycan from bovine follicular fluid enhances the acrosome reaction in bovine spermatozoa.
Biochem. Biophys. Res. Commun **106**: 1092-1098, 1982.

- LENZ, R.W., G.D. WALL, M.L. LEIBFRIED, R.L. AX y N.L. FIRST.- *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes. Biol. Reprod. **29**: 173-179, 1983.
- LETCHER, R., R.C.M. SIMMEN, F.W. BAZER y F.A. SIMMEN.- Insulin-like growth factor-I expression during early conceptus development in the pig. Biol. Reprod. **41**: 1143, 1989.
- LINDNER, H.R., A. TSAFRIRI, M.E. LIEBERMAN, U. ZOR, Y. KOCH, S. BAUMINGER y A. BARNEA.- Gonadotrophin action on cultured Graafian follicles: induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. Recent. Prog. Horm. Res. **30**: 79-138, 1974.
- LONERGAN, P., E. VERGOS, A. KINIS, H. SHARIF, M. GALLAGHER y I. GORDON.- The effect of recovery method on the type of bovine oocyte obtained for *in vitro* maturation. Theriogenology **35**: 231, 1991.
- LONERGAN, P., H. SHARIF, P. MONAGHAN, H. WAHID, M. GALLAGHER y I. GORDON.- Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture *in vitro*. Theriogenology **37**: 248, 1992.
- LOPATA, A., M.J. PATULLO, A. CHANG y B. JAMES.- A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertil. Steril. **27**: 677-684, 1976.
- LU, K.H., M.P. BOLAND, T.F. CROSBY y I. GORDON.- *In vitro* fertilization of cattle oocytes matured *in vitro*. Theriogenology **27**: 251, 1987.
- LU, K.H., I. GORDON, M. GALLAGHER y H. McGOVERN.- Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in-vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. Vet. Rec. **121**: 259-260, 1987.
- LU, K.H., I. GORDON, H. McGOVERN y M. GALLAGHER.- Production of cattle embryos by *in-vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture *in vivo* in sheep. Theriogenology **29**: 272, 1988a.

- LU, K.H., I. GORDON, H.B. CHEN, M GALLAGHER y H. McGOVERN.- Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in-vitro* techniques. Vet. Rec. 122: 539-540, 1988b.
- LU, K.H. y I. GORDON.- Effect of heparin on the capacitation of frozen-thawed bovine spermatozoa used in the *in vitro* fertilization (IVF) of oocytes matured *in vitro*. 11th International Congress on A.R. and A.I. Dublin, p. 339-341, 1988.
- LUTTERBACH, A., R.A. KOLL y G. BREM.- *In vitro* maturation of bovine oocytes in co-culture with granulosa cells and their subsequent development. Zuchthygien 22: 145-150, 1987.
- MARTINEZ, E., S. RUIZ, J. ROCA y J.M. VAZQUEZ.- Fecundación *in vitro* en los animales de granja. Monografía. Universidad de Murcia, 1989.
- MASSAGUE, J. y M.P. CZECH.- The subunit structure of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. J. Biol. Chem. 257: 5038, 1982.
- MASSAGUE, J.- Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human membranes and A431 cells. J. Biol. Chem. 258: 13614-13620, 1983.
- MASUI, Y. y C.L. MARKERT.- cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. J. exp. Zool. 117: 129-146, 1971.
- McGAUGHEY, R.W.- *In vitro* oocyte maturation. En: Methods of mammalian reproduction editado por J.C. Daniel. New York: Academic Press, 1978, p. 1-20.
- McLACHLAN, R.I., D.M. ROBERTSON, H.G. BURGER y D.M. DE KRETZER.- The radioimmunoassay of bovine and human follicular fluid and serum inhibin. Molec. Cell. Endocr. 46: 175-185, 1986.
- McLAREN, A.- Fertilization, cleavage and implantation. En: Reproduction in farms animals, editado por E.S.E. Hafez, 1980, p. 226-246.
- MERCOLA, M. y C.D. STILES.- Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. Development 102: 451, 1988.

- MILLER, G.F., D.L. GIEDT, T.D. LESTER, J.N. PIERSON, J.M. RAKES y R.W. RORIE.- Addition of bovine oviductal epithelial cells (BOEC) and/or penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) to bovine *in vitro* fertilization (IVF) medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology* **37**: 259, 1992.
- MONDSCHNEIN, J.S. y D.W. SCHOMBERG.- Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cells in cultures. *Science* **211**: 1179-1180, 1981.
- MONDSCHNEIN, J.S. y D.W. SCHOMBERG.- Effects of partially and more highly purified platelet-derived growth factor preparations on luteinizing hormone receptor induction in granulosa cell cultures. *Biol. Reprod.* **30**: 603-608, 1984.
- MOOLENAAR, W.H., R.Y. TSIEN, P.T. VAN DER SAAG y S.W. DE LAAT.- Na/K exchange and cytoplasmic pH on the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* **304**: 645, 1983.
- MOOR, R.M. y A.O. TROUNSON.- Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent development capacity. *J. Reprod. Fertil.* **49**: 101-109, 1977.
- MOOR, R.M. y G.M. WARNES.- Regulation of oocyte maturation in mammals. Control of ovulation, editado por D.B. Crichton, G.R. Foxcroft, N.B. Haynes, G.E. Lamming. London: Butterworths, 1978, p. 159-176.
- MOOR, R.M.- Intercellular coupling in mammalian oocytes. En: *Development in Mammals*, editado por M.H. Johnson. Amsterdam: Elsevier, 1980, p. 3-37.
- MOOR, R.M. y J.P. HESLOP.- Cyclic AMP in mammalian follicle cells and oocytes during maturation. *J. Exp. Zool.* **216**: 205-209, 1981.
- MOOR, R.M., J.C. OSBORN e I.M. CROSBY.- Cell interactions and oocyte regulations in mammals. En: *Follicular maturation and ovulation*, editado por R. Rolland, E.V. Hall, S.G. Hillier, K.P. McNatty, J. Shoemaker. 1982, p. 249-264.
- MOOR, R.M. e I.M. CROSBY.- Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *J. Embryol. Exp. Morph.* **94**: 207-220, 1986.

- MOOR, R.M. y F. GANDOLFI.- Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **34**: 55-69, 1987.
- MOORE, G.P.M. y S. LINTER-MOORE.- A correlation between growth and RNA synthesis in the mouse.
J. Reprod. Fertil. **39**: 163, 1974.
- MORGAN, J.F., H.J. MORTAN y R.C. PARKER.- Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **73**: 1, 1950.
- MOTLIK, J., H.H. KOEFOED-JOHNSEN y J. FULKA.- Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated *in vitro*.
J. Exp. Zool. **205**: 377-384, 1978.
- MOTLIK, J., J. FULKA y J.E. FLECHON.- Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation *in vivo* and *in vitro*.
J. Reprod. Fert. **76**: 31-37, 1986.
- MOTLIK, J.- Cytoplasmic aspects of oocyte growth and maturation in mammals.
J. Reprod. Fertil. Suppl. **38**: 17-25, 1989.
- MOTLIK, J. y J. FULKA.- Factors affecting meiotic competence in pig oocytes.
Theriogenology **25**: 87-96, 1986.
- MÜSSE, P.- Einflug hochgereinigter gonadotropine und serum östrischer sauen auf kumuluexpansion und kernreifungsrate porziner oozyten *in-vitro*.
Tesis doctoral. Hannover, 1990.
- NAITO, K., Y. FUKUDA e Y. TOYODA.- Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured *in vitro*.
Gamete Res. **21**: 289-295, 1988.
- NEW, D.A.T.- Development of rat embryos cultured in blood sera.
J. Reprod. Fert. **12**: 509, 1966.
- NEWCOMB, R., W.B. CHRISTIE y L.E.A. ROWSON.- Birth of calves after *in vivo* fertilization of oocytes removed from follicles and matured *in vivo*.
Vet. Rec. **112**: 461-462, 1978.

- NEWPORT, J.W. y M.W. KIRSCHNER.- Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development.
Cell. 37: 731-742, 1984.
- NIWA, K. y M.C. CHANG.- Effects of sperm concentration on the capacitation of rat spermatozoa.
J. Exp. Zool. 189: 353-356, 1974.
- NIWA, K. y O. OHGODA.- Synergistic effect of caffeine and heparin on *in-vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture.
Theriogenology 30: 733-741, 1988.
- NIWA, K., O. OHGODA y M. YUHARA.- Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on *in-vitro* penetration of cattle oocytes.
11th International Congress on A.R and A.I. Dublin, p. 346-348, 1988.
- NORMAN, A.W. y G. LITWACK.- Cell growth factors. En: Hormones, editado por A.W Norman y G. Litwack. San Diego: Academic Press, 1987, p. 719-747.
- OHGODA, O., K. NIWA, M. YUHARA, S. TAKAHASHI y K. KANOYA.- Variations in penetration rates *in vitro* bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls.
Theriogenology 29: 1375-1381, 1988.
- OLSON, S.E., A. ROMERO, W.K. THOMAS y G.E. SEIDEL, Jr.- Effects of FSH and heparin on *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes.
Theriogenology 33: 293, 1990.
- OLSON, S.E., W.K. THOMAS y G.E. SEIDEL, Jr.- Effects of gonadotropins during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryonic development.
Theriogenology 35: 250, 1991.
- OLSON, P., N.M. LOSKUTOFF, J.B. ROBERTSON, T. KROETSCH y K.J. BETTERIDGE.- Cryopreserved semen extenders can induced nuclear activation and/or cytoplasmic fragmentation of bovine ova matured *in vitro*.
Theriogenology 37: 268, 1992.
- OSBORN, J.C. y R.M. MOOR.- The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes.
J. steroid Biochem. 19: 133-137, 1983.

- PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH y N.L. FIRST.- Heparin treatment of ejaculated bovine spermatozoa increases the number of bovine oocytes fertilized *in vitro*. Biol. Reprod. **40**: 163, 1984.
- PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH y N.L. FIRST.- Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. Theriogenology **24**: 527-549, 1985.
- PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, E.S. CRITSER, W.H. EYESTONE y N.L. FIRST.- Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology **25**: 591-600, 1986.
- PARRISH, J.J., J. SUSKO-PARRISH, M.A. WINER y N.L. FIRST.- Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. **38**: 1171-1180, 1988.
- PAVLOV, A., A. LUCAS-HANN y H. NIEMANN.- Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. Mol. Reprod. Dev. **31**: 63-67, 1992.
- PELECH, S.L., D.A. TINKER, C.P. CHANG, y E.G. KREBS.- Role of protein phosphorylation in growth factor signal transduction: En: Insulin, insulin-like growth factors, and their receptors in the central nervous system, editado por M.K. Raizada, M.I. Philips, D. LeRoith. Plenum Press, 1987 p. 27-46.
- PELLICER, A., T.G. PARMER, J.M. STOANE y H.R. BEHRMAN.- Desensitization to follicle stimulate hormone in cumulus cells in coincident with hormone induction of oocyte maturation in the rat follicle. Mol. Cell. Endocrinol. **64**: 179-88, 1989.
- PETERS, H. y K.P. McNATTY.- The ovary, editado por Granada Publ., London, 1980.
- PINCUS, G. y E.V. ENZMANN.- The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. J. exp. Med. **62**: 655-675, 1935.
- PINCUS, G.- The eggs of mammals. New York: Macmillan, 1936.

- RAPOLEE, D.A., C.A. BRENNER, R. SCHULTZ, D. MARK y Z. WERB.-
Developmental expression of PDGF, TGF- α and TGF- β genes in the
preimplantation mouse embryos.
Science **241**: 1823-24, 1988.
- ROBERTS Jr., C.T. y D. LEROITH.- Interactions in the insulin-like growth factor signaling
system.
NIPS **7**: 69-77, 1992.
- ROLDAN, E.R.S. y M. GOMENDIO.- Morphological, functional and biochemical changes
underlying the preparation and selection of fertilising spermatozoa *in vivo*. En:
Clinical Trends and Basic Research in Animal Reproduction, editado por S.J.
Dieleman, B. Colenbrander, P. Booman, T. Van der Lende. Amsterdam: Elsevier,
1992, p. 69-78.
- ROMERO, A., W. NAUTA y G.E. SEIDEL, Jr.- A meiotic stimulator in bovine follicular
fluid is retained in a fraction larger than 100.000 daltons.
Theriogenology **37**: 286, 1992.
- ROSE, T y B.D. BAVISTER.- Effect of oocyte maturation medium on *in vitro* development
of *in vitro* fertilized bovine embryos.
Mol. Reprod. Dev. **31**: 72-77, 1992.
- ROSENFELD, R.G. y D.A. DOLLAR.- Characterization of somatomedin C/insulin-like
growth factor I (SM/IGF-I) receptor on cultured human fibroblast
monolayers: regulation of receptor concentrations by SM-C/IGF-I and insulin.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **55**: 161-162, 1982.
- ROTHSTEIN, H.- Regulation of the cell cycle by somatomedins.
Int. Rev. Cytol. **78**: 127-131, 1982.
- ROZENGURTZ, E.- Early signals in mitogenic response.
Science **234**: 161, 1986.
- SAEKI, K., M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE y N.L. FIRST. Are fetal calf serum and
hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent
development?
Theriogenology **33**: 316, 1990.

- SANBUISSHO, A. y W.R. THRELFALL.- The effect of estrous cow serum on the maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte *in vitro*.
Theriogenology **31**: 693-699, 1989.
- SANBUISSHO, A., S. COSKUN y Y.C. LIN.- Stimulatory action of epidermal growth factor (EGF) on *in vitro* bovine oocyte maturation.
Assisted Reprod. Tec./Androl. **1**: 143-153, 1990.
- SANBUISSHO, A., S. COSKUM y Y.C. LIN.- Role of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) *in vitro* on bovine oocyte maturation.
Theriogenology **38**: 153-163, 1992.
- SASAKI, N., R.W. REES-JONES, Y. ZICK, P.S. NISSLEY y M.M. RECHLER.- Characterization of insulin-like growth factor I stimulated tyrosine kinase activity associated with the β -subunit of type I insulin-like growth factor receptors of rat liver cells.
J. Biol. Chem. **260**: 9793-9798, 1985.
- SATHATHANTHAN, A.H. y C. CHEN.- Sperm-oocyte membrane fusion in the human during monospermic fertilization.
Gamete Res. **15**: 177-186, 1986.
- SATO, E., A. IRITANI y Y. NISHIKAWA.- Factors involving in maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*.
Jap. J. Anim. Reprod. **23**: 12-18, 1977.
- SATO, E., y S.S. KOIDE.- A factor from bovine granulosa cells preventing oocyte maturation.
Differentiation **26**: 59-62, 1984.
- SATO, E., M. MATSUO y H. MIYAMOTO.- Meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*: improvement of meiotic competence by dibutyl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate.
J. Anim. Sci. **68**: 1872-1887, 1990.
- SCHELLANDER, K., F. FUHRER, B.G. BRACKETT, H. KORB y W. SCHLEGER.- *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum.
Theriogenology **33**: 477-485, 1990.

- SCHROEDER, A.C. y J.J. EPIGG.- Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*.
Symposium on Fertilization in Mammals 43, Boston, 1989.
- SCHULTZ, R.M., R. MONTGOMERY, P.W. WARD-BAILEY y J.J. EPIGG.- Regulation of oocyte maturation in the mouse: possible roles of intercellular communication, cAMP and testosterone.
Devl. Biol. 95: 294-304, 1983.
- SHALGI, R., N. DEKEL y P.F. KRAICER.- The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured *in vitro*.
J. Reprod. Fertil. 55: 429-435, 1979.
- SHALGI, R.- Developmental capacity of rat embryos produced by *in-vitro* or *in-vivo* fertilization.
Gamete Res. 10: 77-82, 1984.
- SHALGI, R., J. SELIGMAN y N.S. KOSOWER.- Dynamics of thiols in the epididymal sperm and fluid.
Symposium on Fertilization in Mammals 44, Boston, 1989.
- SHEA, B.F., J.P.A. LATOUR, K.N. BEDIRIAN y R.D. BAKER.- Maturation *in vitro* and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes.
J. Anim. Sci. 43: 809-815, 1976.
- SHI, D.S., K.H. LU e I. GORDON.- Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro*.
Theriogenology 33: 324, 1990.
- SHIIGI, S.M. y R.I. MISHELL.- Sera and the *in vitro* induction of immuno-responses I. Bacterial contamination and the generation of good fetal bovine sera.
J. Immunol. 115: 741, 1975.
- SHIOYA. Y., M. KUWAYAMA, M. FUKUSHIMA, S. IWASAKI y A. HANADA.- *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*.
Theriogenology 30: 489-496, 1988.

- SIRARD, M.A. y R.D. LAMBERT.- *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy.
Biol. Reprod. **33**: 487-494, 1985.
- SIRARD, M.A., R.D. LAMBERT, D.P. MENARD y M. BEDOYA.- Pregnancies after *in vitro* fertilization of cow follicular oocytes, their incubation in rabbit oviduct and their transfer to the cow uterus.
J. Reprod. Fert. **73**: 273-282, 1985.
- SIRARD, M.A. y R.D. LAMBERT.- Birth of calves after *in vitro* fertilization using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes.
Vet. Rec. **119**: 167-169, 1986.
- SIRARD, M.A. y N.L. FIRST.- *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in the bovine.
Biol. Reprod. **39**: 229-234, 1988.
- SIRARD, M.A., J.J. PARRISH, C.B. WARE, M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE y N.L. FIRST.- The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos.
Biol. Reprod. **39**: 546-552, 1988.
- SIRARD, M.A.- Practical aspects of *in-vitro* fertilization in cattle.
J. Reprod. Fert. **38**: 127-134, 1989.
- SIRARD, M.A. y S. BILODEAU. - The effect of cell supplementation and cAMP accumulation in meiotic resumption in the bovine oocyte.
Symposium on Fertilization in Mammals 44, Boston, 1989.
- SIRARD, M.A., H.F. FLORMAN, M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, F.L. BARNES, M.L. SIMS y N.L. FIRST.- Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes.
Biol. Reprod. **40**: 1257-1263, 1989.
- SIRARD, M.A., K. COENEN y S. BILODEAU.- Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes.
Theriogenology **37**: 39-57, 1992.
- SKINNER, M.K., J. KESKI-OJA, K.G. OSTEEEN y H.L. MOSES.- Ovarian thecal cells produce transforming growth factor- β which can regulate granulosa cell growth.
Endocrinology **121**: 786-792, 1987.

- SKINNER, M.K., D. LOBB y L.H. DORRINGTON.- Ovarian thecal/interstitial cell produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology* **121**: 1892-1899, 1987.
- SMITH, D.M. y D.Y. TENNEY.- Effects of steroids on mouse oocyte maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **60**: 331-338, 1980.
- SOMMER, P., D. RATH y H. NIEMANN.- *In vitro* maturation of porcine oocytes in the presence of follicular granulosa cells, FSH and or EGF. 12 th. Internacional Congress on Animal Reproduction: 378-380, 1992.
- SOMMERCORN, J., J.A. MULLIGAN, F.J. LOZEMAN y E.G. KREBS.- Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8834-8838, 1987.
- STEPTOE, P.C. y R.G. EDWARDS.- Birth after the reimplantation of an human embryo. *Lancet*. **12**: 366, 1978.
- SREENAN, J.- *In vitro* maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes. *J. Agric. Sci. Camb.* **75**: 393-396, 1970.
- STAIGMILLER, R.B. y R.M. MOOR.- Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res.* **9**: 221-229, 1984.
- ST-ARNAUD, R., P. WALKER, P.A. KELLY y F. LABRIE.- Rat ovarian epidermal growth factor receptors. Characterization and hormonal regulation. *Mol. Cell Endocrinol.* **31**: 43-52, 1983.
- STUBBINGS, R.B., K.J. BETERIDGE y P.K. BASRUR.- Investigations of cultured requirements for bovine oocyte maturation *in-vitro*. *Theriogenology* **29**: 313, 1988.
- STUBBINGS, R.B., J.S. WALTON, D.T. ARMSTRONG y P.K. BASRUR.- Recovery of bovine oocytes from small vesicular follicles for *in vitro* maturation and fertilization. *Vet. Res. Comm.* **14**: 71-81, 1990.
- SUGIE, T., G.E. SEIDEL y E.S.E. HAFEZ.- Embryo-transfer. En: *Reproduction in Farm Animals*, editado por E.S.E. Hafez. Philadelphia: Lea y Febirger, 1980, p. 569-594.

- SUSKO-PARRISH, J.L., M.B. WHEELER, R.L. AX, N.L. FIRST y J.J. PARRISH.- The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite, on bovine *in vitro* fertilization.
Theriogenology **33**: 333, 1990.
- SUSKO-PARRISH, J., H. AKTAS y M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE.- The effect of energy substrates during maturation on the fertilization and development of bovine oocytes.
Theriogenology **37**: 305, 1992.
- SUSS, U. y K. WUTHRICH.- Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes matured *in vitro*.
Theriogenology **23**: 231, 1985.
- SUSS, U., K. WUTHRICH y G. STRANZINGER.- Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*.
Biol. Reprod. **38**: 871-880, 1988.
- SZÖLLÖSI, D. y R.G. EDWARDS.- Cytoplasmic changes in the mammalian oocytes during the preovulatory period. En: Fertilization of the human egg *in vitro*, editado por H.M. Beier y H.R. Lindner. Berlin: Springer-Verlag, 1983, p. 35-55.
- TAKAGI, Y., K. MORI, T. TAKAHASHI, S. SUGAWARA y J. MASAKI.- Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing.
J. Anim. Sci. **70**: 1923-1927, 1992.
- TAKAHASHI, M., S.S. KOIDE y P.K. DONAHOE.- Müllerian inhibiting substance as oocyte meiosis inhibitor.
Molec. cell. Endocrinol. **47**: 225-234, 1986.
- TALBOT, P.- Sperm penetration through oocyte investments in mammals.
Am. J. Anat. **174**: 331-346, 1985.
- TAPANAINEN, J., P.J. LEIONEN y P. TAPANAINEN.- Regulation of human granulosa-luteal cells progesterone production and proliferation by gonadotropins and growth factors.
Fertil. Steril. **48**: 576-580.
- TAYLOR, J.M., S. COHEN y W.M. MITCHELL.- Epidermal growth factor: high and low molecular weight forms.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **67**: 164, 1970.

- TELFORD, N.A., A.J. WATSON y G.A. SCHULTZ.- Transition from maternal to embryonic control in nearly mammalian development: a comparison of several species.
Mol. Reprod. Dev. **26**: 90-100, 1990.
- THIBAUT, C.- La culture *in vitro* de l'oeuf de vache.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. **6**: 159-164, 1966.
- THIBAUT, C. y M. GERARD.- Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocytes *in vitro*.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. **13**: 145-156, 1973.
- THIBAUT, C., M. GERARD y Y. MENEZO.- Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation.
J. Reprod. Fertil. **45**: 605-610, 1975a.
- THIBAUT, C., M. GERARD y Y. MENEZO.- Acquisition par l'ovocyte de lapine et de veau du facteur de decondensation du noyau du spermatozoïde fécondant (MPGF).
Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. **15**: 705-714, 1975b.
- THIBAUT, C. y L. DAIZIER.- Analyse des conditions de la fécondation *in vitro* de l'oeuf de lapine.
Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. **1**: 277, 1976.
- THIBAUT, C.- Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?
J. Reprod. Fertil. **51**: 1-15, 1977.
- THIBAUT, C., D. SZOLLOSI y M. GERARD.- Mammalian oocyte maturation.
Reprod. Nutr. Develop. **27**: 865-896, 1987.
- TONETTA, S.A. y G.S. DIZEREGA.- Intraovarian regulation of follicular maturation.
Endocr. Rev. **10**: 205-229, 1989.
- TOYODA, Y. y M.C. CHANG.- Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer.
J. Reprod. Fert. **36**: 9-22, 1974.
- TOYODA, Y.- IVF in domestic animals.
Symposium on Fertilization in Mammals 28, Boston, 1989.

- TROUNSON, A.O., S.M. WILLADSEN y L.E.A. ROWSON.- Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured *in vitro* and *in vivo* and transferred to the oviducts of rabbits and cows.
J. Reprod. Fert. **51**: 321-327, 1978.
- TSAFRIRI, A. y C.P. CHANNING.- Inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*.
Endocrinology **96**: 922-927, 1975.
- TSAFRIRI, A., C.P. CHANNING, S.H. POMERANTZ y H.R. LIDNER.- Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid.
J. Endocrinol. **75**: 285-291, 1977.
- TSAFRIRI, A. - Oocyte maturation in mammals. En: The vertebrate ovary, editado por R.E. Jones. New York: Plenum Press, 1978, p. 409-433.
- TSAFRIRI, A. y S. BAR-AMI.- Oocyte maturation inhibitor: A 1981 perspective. En: Intraovarian control mechanisms, editado por C.P. Channing, S.J. Segal. New York: Plenum Press, 1982, p. 201-223.
- TSAFRIRI, A., N. DEKEL y S. BAR-AMI.- The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation.
J. Reprod. Fert. **64**: 542-551, 1982.
- TSUTSUMI, O., H. KURACHI y T. OKA.- A physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function.
Science, **233**: 975-977, 1986.
- USUI, N. y R. YANAGIMACHI.- Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization, and early development.
J. Ultrastruct. Res. **57**: 276-299, 1976.
- VAZQUEZ, I., E.F. GRAHAM, M.J. ILLERA, R. NUÑEZ y P. CABALLERO.- Maduración in vitro de oocitos foliculares.
XIX Congreso nacional de la Sociedad Española de Fertilidad. 1990.
- VELDHUIS, J.D., R.J. RODGERS, A. DEE y E.R. SIMPSON.- The insulin-like factor, somatomedin-C, induces the synthesis of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and adrenodoxin in ovarian cells.
J. Biol. Chem. **261**: 2499-2502, 1986.

- VELDHUIS, J.D., R.J. RODGERS y R.W. FURLANETTO.- Synergistic actions of estradiol and the insulin-like growth factor somatomedin-C on swine ovarian (granulosa) cells.
Endocrinology **119**: 530-538, 1986.
- VELDHUIS, J.D., J.E. NESTLER y J.F. STRAUSS.- The insulin-like growth factor, somatomedin-C, modulates low density lipoprotein metabolism by swine granulosa cells.
Endocrinology **121**: 340-346, 1987.
- VLODAVSKY, I., K.D. BROWN y D. GOSPODAROWICZ.- A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells.
J. Biol. Chem. **253**: 3744-3750, 1978.
- VOROEVA, D.A. y A.I. NIKITIN.- The effect of hormones and growth factor on the course of meiosis in oocytes in culture.
Tsitologiya **33**: 92-99, 1991.
- WEELER, M.B. y G.E. SEIDEL.- Time course of *in vitro* capacitation of frozen unfrozen bovine spermatozoa.
Theriogenology **25**: 216, 1986.
- WASSARMAN, P.M.- The mammalian ovum. En: The Physiology of Reproduction, editado por E. Knobil y J.D. Neill. New York: Raven Press, 1988, p. 69-102.
- WASSARMAN, P.M.- La fecundación en los mamíferos.
Investigación y Ciencia **149**: 48-55, 1989.
- WESTERGAARD, L.G. y C.Y. ANDERSEN.- Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles.
Human Reprod. **4**: 257-260, 1989.
- WHITTINGHAM, D.C.- Culture of mouse ova.
J. Reprod. Fert. **14**: 7-21, 1971.
- WHITTEN, W.K.- Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. En: Schering Symposium on Intrinsic and Extrinsic Factors in Early Mammalian Development, Advances in the Biosciences, editado por G. Raspe. Oxford: Pergamon Press, 1971, p. 129-141.

- WIEMER, K.E., A.W. WATSON, V. POLANSKI, A.I. McKENNA, G.H. FICK y G.A. SCHULTZ.- Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine.
Mol. Reprod. Dev. **30**: 330-338, 1991.
- WURTH, Y.A. y Th.A.M. KRUIP.- Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. 12th Internacional Congress on Animal Reproduction: 387-389, 1992.
- XU, K.P., T. GREVE, S. SMITH y P. HYTTEL.- Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation *in vitro*.
Acta Vet. Scand. **27**: 505-519, 1986.
- XU, K.P., T. GREVE, M. CALLESEN y P. HYTTEL.- Pregnancy resulting from *in-vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro*.
J. Reprod. Fert. **81**: 501-504, 1987.
- XU, K.P. y T. GREVE.- A detailed analysis of early events during *in-vitro* fertilization of bovine follicular oocytes.
J. Reprod. Fert. **82**: 127-134, 1988.
- YANAGIMACHI, R.- *In vitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid.
J. Reprod. Fertil. **18**: 275-286, 1969.
- YANAGIMACHI, R.- The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation.
J. Reprod. Fertil. **25**: 193-196, 1970.
- YANAGIMACHI, R. e Y.D. NODA.- Ultrastructural changes in the hamster sperm head during fertilization.
J. Ultrastruct. Res. **31**: 465,485, 1970a.
- YANAGIMACHI, R. e Y.D. NODA.- Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: A necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells.
J. Ultrastruct. Res. **31**: 486-493, 1970b.
- YANAGIMACHI, R. y N. USUI.- Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of the guinea pig spermatozoa.
Exp. Cell. Res. **89**: 161-174, 1974.

- YANAGIMACHI, R., H. YANAGIMACHI y B.J. ROGERS.- The use zona free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa.
Biol. Reprod. 15: 471-476, 1976.
- YANAGIMACHI, R.- Mechanisms of fertilization in mammals. En: Fertilization and embryonic development *in vitro*, editado por L. Mastroianni y J.D. Biggers. New York: Plenum Press, 1981, p. 81-182.
- YANAGIMACHI, R.- Mammalian fertilization. En: The physiology of reproduction, editado por E. Knobil y J.D. Neill. New York: Raven Press, 1988, p. 135-186.
- YANG, H.C. y A.B. PARDEE.- Insulin-like growth factor-I regulation of transcription and replicating enzyme induction necessary for DNA synthesis.
J. Cell. Physiol. 127: 410-416, 1986.
- YANG, C-H. y R. YANAGIMACHI.- Differences between mature ovarian and oviductal oocytes: a study using the golden hamster.
Human Reprod. 4: 63-71, 1989.
- YANG, N.S., K.H. LU y I. GORDON.- *In vitro* fertilization and culture of bovine oocytes from stored ovaries.
Theriogenology 33: 352, 1990.
- YANG, Y.B. y K.H. LU.- The influence of bovine oocyte type on *in vitro* fertilization and subsequent development *in vitro*.
Theriogenology 33: 355, 1990.
- YANKNER, B.A y E.M. SHOOTER.- Nerve growth factor in the nucleus: interaction with receptors on the nuclear membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 1269, 1979.
- YOUNIS, A.I., B.G. BRACKETT y R.A. FAYRER-HOSKEN.- Influence of serum and hormone on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*.
Gamete. Res. 23: 189-201, 1989.
- YOUNIS, A.I. y B.G. BRACKETT.- Thyroid stimulating hormone enhancement of bovine oocyte maturation *in vitro*.
Mol. Reprod. Dev. 31: 144-151, 1992.

- YOSHIDA, M., K. ISHIGAKI y V.G. PURSELL.- Effect of maturation media on male pronucleus formation in pig oocytes matured *in vitro*.
Mol. Reprod. Dev. **31**: 68-71, 1992.
- ZAMBONI, L.- Ultraestructure of mammalian oocytes and ova.
Biol. Reprod. **2** (Suppl. 1): 44-63, 1970.
- ZHANG, Z.W., R.S. CARSON, A.C. HERINGTON, V.W. LEE y H.G. BURGER.- Follicle-stimulating hormone and somatomedin-C stimulate inhibin production by rat granulosa cells *in vitro*.
Endocrinology **120**: 1633-1638, 1987.
- ZHANG, L., E.G. BLAKEWOOD, R.S. DENNISTON y R.A. GODKE.- The effect of insulin on maturation and development of *in vitro*-fertilized bovine oocytes.
Theriogenology **35**: 301, 1991.
- ZUCKERMAN, S.- The ovary. Vol. I. New York: Academic Press, 1962.
- ZUELKE, K.A., A.I. YOUNIS y B.G. BRACKETT.- Enhanced oocyte maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation.
Symposium on Fertilization in Mammals 47, Boston, 1989.
- ZUELKE R.A., y B.G. BRACKETT.- Luteinizing hormone-enhanced *in vitro* maturation in bovine oocytes with and without protein supplementation.
Biol. Reprod. **43**: 784-787, 1990.
- ZUMSTEIN, P. y C.D. STILES.- Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor-I.
Biol. Chem. **262**: 11252, 1987.

Nota: esta bibliografía se ha confeccionado siguiendo las normas de la American Physiological Society.

ESQUEMA 1. OOGENESIS EN LA VACA	8
ESQUEMA 2.- ENTRADA DEL ESPERMATOZOIDE EN EL OOCITO BOVINO (Hyttel <i>et al.</i> , 1989)	41
ESQUEMA 3.- CRONOLOGIA DE LA INTERACCION OOCITO ESPERMATOZOIDE EN LA FECUNDACION BOVINA (Crozet, 1984; Hyttel, 1988; Hyttel <i>et al.</i> , 1989)	43
ESQUEMA 4.- TECNICA DE FIJACION DE OOCITOS	94
ESQUEMA 5.- VALORACION DE EXPANSION DEL CUMULO CELULAR	96
FIGURA 1.- ESTRUCTURA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (Norman y Litwak, 1987)	61
FIGURA 2.- ESTRUCTURA GLOBULAR DE LA INSULINA, PROINSULINA Y FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA (IGF) (Norman y Litwak, 1987)	65

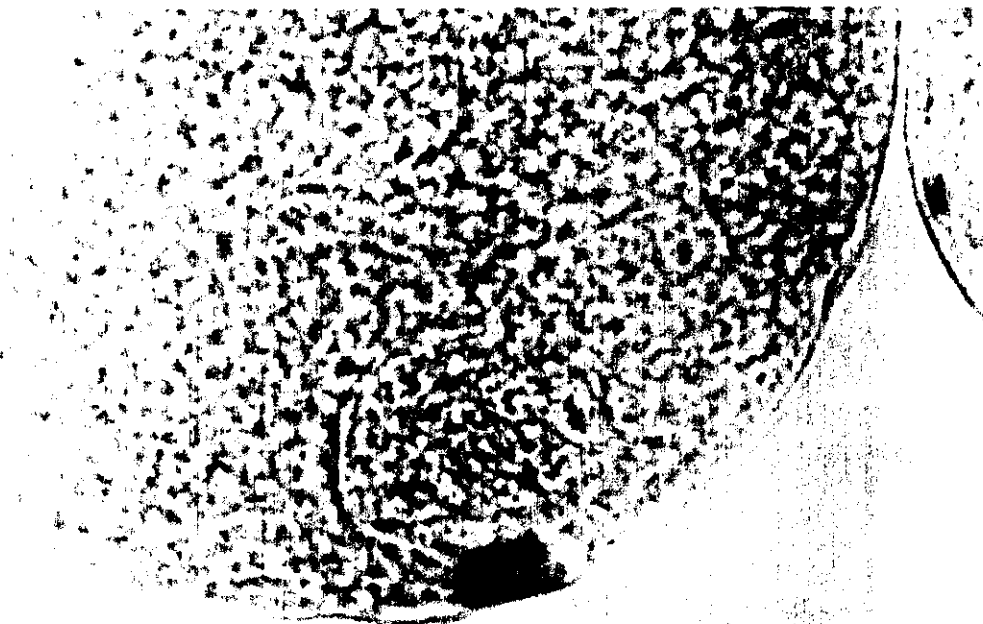
INDICE DE FOTOGRAFIAS.

A.- VESICULA GERMINAL. 1000 aumentos (aprox).

B.- TELOFASE I. 1000 aumentos (aprox).

C.- PERIODO DE INSEMINACION. OOCITO CON DOS CORPUSCULOS POLARES RODEADO DE ESPERMATOZOIDES. (400 aumentos).

D.- EMBRIONES DE DOS Y CUATRO CELULAS. 24 H DESPUES DE LA INSEMINACION. (400 aumentos).



A

